

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1]

A duplicate of a human immunodeficiency virus (HIV). Double strand short interference nucleic acid to check. (siNA) Are a molecule, one chain of said double strand siNA molecule is an antisense strand including a nucleotide sequence of HIV RNA, or a nucleotide sequence complementary to the part, and a chain of another side a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence of an antisense strand. A siNA molecule which is an included sense strand and is characterized by most pyrimidine nucleotides which exist in said double strand siNA molecule including sugar ornamentation.

[Claim 2]

The siNA molecule according to claim 1 in which HIV RNA contains HIV-1 RNA.

[Claim 3]

The siNA molecule according to claim 1 in which HIV RNA contains HIV-2 RNA.

[Claim 4]

The siNA molecule according to claim 1 in which a siNA molecule does not contain ribonucleotide.

[Claim 5]

The siNA molecule according to claim 1 in which a siNA molecule contains ribonucleotide.

[Claim 6]

The siNA molecule according to claim 1 in which all the pyrimidine nucleotides in a siNA molecule include sugar ornamentation.

[Claim 7]

An embellished pyrimidine nucleotide 2'-deoxy pyrimidine, 2'-O-alkyl pyrimidine, 2'-C-alkyl pyrimidine, 2'-deoxy 2'-fluoro-pyrimidine, 2'-aminopyrimidine, 2'-methoxy-ethoxypyrimidine, And the siNA molecule according to claim 6 chosen from independent or arbitrary combination of a 2'-O,4'-C-methylene pyrimidine nucleotide.

[Claim 8]

The siNA molecule according to claim 7 whose 2'-O-alkyl pyrimidine nucleotide is 2'-O-methyl or 2'-O-allyl.

[Claim 9]

The siNA molecule according to claim 1 complementary to RNA which encodes HIV protein or its fragmentation in a nucleotide sequence of an antisense strand of a double strand siNA molecule.

[Claim 10]

The siNA molecule according to claim 1 complementary [ chain / of a siNA molecule / each / including about 19 to about 29 nucleotides ] to a nucleotide of a chain of another side in each chain which contains about 19 nucleotides at least.

[Claim 11]

The siNA molecule according to claim 1 in which said siNA molecule is assembled from two oligonucleotide fragmentation, one fragmentation includes a nucleotide sequence of an antisense strand of a siNA molecule, and the 2nd fragmentation includes a nucleotide sequence of a sense strand of a siNA molecule.

## [Claim 12]

The siNA molecule according to claim 1 by which a sense strand is connected with an antisense strand via a linker molecule.

## [Claim 13]

The siNA molecule according to claim 12 in which said linker molecule is a polynucleotide linker.

## [Claim 14]

The siNA molecule according to claim 12 in which said linker molecule is a non-nucleotide linker.

## [Claim 15]

The siNA molecule according to claim 1 whose arbitrary pyrimidine nucleotides which exist in a sense strand are 2'-deoxy 2'-fluoro pyrimidine nucleotides and whose arbitrary purine nucleotides which exist in a sense field are 2'-deoxy purine nucleotides.

## [Claim 16]

The siNA molecule according to claim 1 to which an end cap ingredient exists including a three-dash terminal and a five prime end in both a five prime end of said sense strand, a three-dash terminal or a five prime end, and a three-dash terminal in a sense strand.

## [Claim 17]

The siNA molecule according to claim 16 in which said end cap ingredient is a part for reversal deoxy salt-free Motonari.

## [Claim 18]

The siNA molecule according to claim 1 in which an antisense strand contains 1 or a 2'-deoxy 2'-fluoro pyrimidine nucleotide beyond it and 1, or a 2'-O-methyl purine nucleotide beyond it.

## [Claim 19]

The siNA molecule according to claim 1 whose arbitrary pyrimidine nucleotides which exist in an antisense strand are 2'-deoxy 2'-fluoro pyrimidine nucleotides and whose arbitrary purine nucleotides which exist in an antisense strand are 2'-O-methyl purine nucleotides.

## [Claim 20]

The siNA molecule according to claim 1 to which an antisense strand includes combination between phosphorothioate nucleotides in a three-dash terminal of said antisense strand.

## [Claim 21]

The siNA molecule according to claim 1 to which an antisense strand includes glyceryl ornamentation in a three-dash terminal of said antisense strand.

## [Claim 22]

The siNA molecule according to claim 1 in which each chain of a siNA molecule contains 21 nucleotides.

## [Claim 23]

The siNA molecule according to claim 22 in which about 19 nucleotides of each chain of a siNA molecule carry out base pair formation to a complementary nucleotide of a chain of another side of a siNA molecule, and at least two three-dash terminal nucleotides of each chain of a siNA molecule do not carry out base pair formation to a nucleotide of a chain of another side of a siNA molecule.

## [Claim 24]

The siNA molecule according to claim 23 whose two three-dash terminal nucleotides of each fragmentation of a siNA molecule are 2'-deoxy pyrimidines.

## [Claim 25]

The siNA molecule according to claim 24 whose 2'-deoxy pyrimidine is 2'-deoxy thymidine.

## [Claim 26]

The siNA molecule according to claim 22 in which 21 nucleotides of each chain of a siNA molecule carry out base pair formation to a complementary nucleotide of a chain of another side of a siNA molecule.

## [Claim 27]

The siNA molecule according to claim 22 in which about 19 nucleotides of an antisense strand carry out base pair formation to a nucleotide sequence of HIV RNA, or its part.

## [Claim 28]

The siNA molecule according to claim 22 in which 21 nucleotides of an antisense strand carry

out base pair formation to a nucleotide sequence of HIV RNA, or its part.

[Claim 29]

The siNA molecule according to claim 1 in which a five prime end of an antisense strand may contain a phosphate group arbitrarily.

[Claim 30]

The siNA molecule according to claim 1 complementary to a nucleotide sequence of a 5'-untranslation region of HIV RNA, or its part in a nucleotide sequence of an antisense strand, or its part.

[Claim 31]

The siNA molecule according to claim 1 complementary to a nucleotide sequence of HIV RNA which exists in RNA of all the HIV(s), or its part in a nucleotide sequence of an antisense strand, or its part.

[Claim 32]

A medicinal composition which contains the siNA molecule according to claim 1 in a carrier which can be permitted, or a diluent.

[Claim 33]

Drugs containing the siNA molecule according to claim 1.

[Claim 34]

An active ingredient containing the siNA molecule according to claim 1.

[Claim 35]

Are a duplicate of a human immunodeficiency virus (HIV) use of a double strand short interference nucleic acid (siNA) molecule to check, and here, One side of a chain of a double strand siNA molecule HIV. A nucleotide sequence of RNA. Or a nucleotide sequence complementary to the part. Use which it is an included antisense strand, and a chain of another side is a sense strand which includes a complementary nucleotide sequence in a nucleotide sequence of an antisense strand, and is characterized by most pyrimidine nucleotides which exist in a double strand siNA molecule including sugar ornamentation.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁(JP)

(A) 報公許特表公 (12)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-50269-

(43) 公表日 平成18年1月28日(2006.1.28)

(51) Int. Cl.

12

FILED 11/03/00 7NAA

7-430-1 (25)

C 12 N	15/09	(2006. 01)
A 61 K	31/7/05	(2006. 01)
A 61 P	31/18	(2006. 01)

A61K 31/18  
A61P 31/18

審查請求 未請求 予備審查請求 未請求 (全 126 頁)

(21) 出版番号	特報2003-5691S5 (2003.8.5691S5)	(71) 出版人	5020303684 サイ・チー・エス・アイ・インターナショナル・インコーポレーテッド
(68) (22) 出版日	平成15年9月20日 (2003.8.20)		レイ・ツツ
(85) 題文出版日	平成16年9月16日 (2004.8.16)		Sirina Therapeutics, Inc.
(86) 国際出版番号	PCT/US2003/005190		アメリカ合衆国コロラド州80301, ボウルダー, ウィルダネス・プレイス 2950
(87) 国際公報日	平成15年8月28日 (2003.8.28)		
(31) 優先権主張番号	60/358,580	(74) 代理人	230104019 弁理士 大野 聖二
(32) 優先日	平成14年2月20日 (2002.2.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100105840 弁理士 森田 耕司
(31) 優先権主張番号	60/363,124		
(32) 優先日	平成14年3月11日 (2002.3.11)	(74) 代理人	弁理士 森田 耕司
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/374,722	(74) 代理人	100105391 弁理士 田中 紳子
(32) 優先日	平成14年4月28日 (2002.4.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

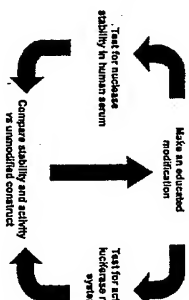
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 短干渉核酸 (s i n a) を用いるH I V 遺伝子発現のRNA干渉媒介性阻害

最終頁に続く

(57) 【要約】

本発明は、種々の用途、例えば、治療、診断、予防的評価、およびゲノム発見用途における使用において、とくに有価な不全セリウス (HIV) の遺伝子表現を抑制するに有効な方法および試薬に関する。詳細には、本発明は、HIV 遺伝子の発現および/または活性に対する RNA 干渉 (RNAi) を媒介しうる小核酸分子、例えば、短干渉 RNA (siRNA)、短干渉 RNA (siRNA)、二本鎖 RNA (dsRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、本鎖 RNA (ssRNA)、セリウス RNA (cRNA) 分子に関する。小核酸分子は、HIV 感染、AIDS、および HIV 感染 IIV の発症または活性の調節に反応する他の宿主の発症または病気の治療において有用である。



## 【特許請求の範囲】

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸 (siRNA) 分子は、これまで、前記二本鎖 siRNA 分子の一方の鎖は HIV・RNA のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、前記二本鎖 siRNA 分子中に存在するトリミジンヌクレオチドの大部分は糖修飾を含むことを特徴とする siRNA 分子。

【請求項2】  
HIV RNAがHIV-1 RNAを含む，請求項1記載のssRNA分子。

【請求項3】  
HIV RNAがHIV-2 RNAを含む，請求項1記載のsRNA分子。

s i N A分子がリボヌクレオチドを含まない，請求項1記載のs i N A分子。

【請求項5】  
s1NA分子がリボヌクレオチドを含む、請求項1記載のs1NA分子。

5. 1. NNA分子中のすべてのトリミジンスケレオチドが糖修飾を含む, 請求項1記載の5. 1. NNA分子。

修飾されたトリミジンスケルトオチドが、2'-デオキシ-トリミジン、2'-オースルキルトリミジン、2'-C-アルキルトリミジン、2'-デオキシ-2'-フルオロ-トリミジン、2'-アミノトリミジン、2'-メトキシ-トリミジン、および2'-O,4'-C-メチレントリミジンスケルトオチドの単独または任意の組み合わせから選ばれる、請求項6記載のsRNA分子。

2'-O-アルキルトリミジンヌクレオチドが2'-O-メチルまたは2'-O-アリルである，請求項7記載のsINA分子。

二本鎖 s i N A 分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列が、H I V 蛋白質またはそのフラグメントをコードする R N A に相補的である、請求項 1 記載の s i N A 分子。

SiNA分子の各鎖が約19-約29ヌクレオチドを含み、各鎖が他方の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19ヌクレオチドを含む、請求項1記載のSiNA分子。

前記  $\text{SiNA}$  分子が2つのオリゴヌクレオチドブランチポイントから組み立てられ、一方のブランチポイントは  $\text{SiNA}$  分子のアリルセレン鎖のヌクレオチド配列を含み、第2のブランチポイントは  $\text{SiNA}$  分子のセレン鎖のヌクレオチド配列を含む。請求項1記載の  $\text{SiNA}$  分子

【請求項12】  
センズ鎖がリソカー分子を介してアソチセンズ鎖と連結されている、請求項1記載のs1  
NA分子。

【請求項13】  
前記リソカー分子がポリスチレンオキシドリンカーである、請求項12記載のs i N A分子。

【請求項14】  
前記リソカー分子が非ヌクレオチドリソカーである、請求項12記載のs i N A分子。

センス鎖に存在する任意のポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであり、センス領域に存在する任意のポリンスクアレオチドが2'-デオキシポリンスクアレオチドである。請求項1記載のSINA分子。



【請求項16】 末端および5'末端を含み、前記センス鎖の5'末端、3'末端、または5'末端および3'末端の両方に末端キヤップ成分が存在する、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項17】

前記末端キヤップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項16記載のs i n A分子。

【請求項18】

アプテセンス鎖が、1またはそれ以上の2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドおよび1またはそれ以上の2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドを含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項19】

アプテセンス鎖に存在する任意のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、アプテセンス鎖に存在する任意のプリンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項20】

アプテセンス鎖が前記アプテセンス鎖の3'末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項21】

アプテセンス鎖が前記アプテセンス鎖の3'末端にグリセリル修飾を含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項22】

s i n A分子の各鎖が21ヌクレオチドを含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項23】

s i n A分子の各鎖の約19ヌクレオチドがs i n A分子の他方の鎖の相補的ヌクレオチドと塩基対形成し、s i n A分子の各鎖の少なくとも2つの3'末端ヌクレオチドがs i n A分子の他方の鎖のヌクレオチドと塩基対形成しない、請求項22記載のs i n A分子。

【請求項24】

s i n A分子の各プログラメントの2つの3'末端ヌクレオチドが2'-デオキシ-ピリミジンである、請求項23記載のs i n A分子。

【請求項25】

2'-デオキシ-ピリミジンが2'-デオキシ-チミジンである、請求項24記載のs i n A分子。

【請求項26】

s i n A分子の各鎖の21ヌクレオチドがs i n A分子の他方の鎖の相補的ヌクレオチドと塩基対形成する、請求項22記載のs i n A分子。

【請求項27】

アプテセンス鎖の約19ヌクレオチドがH I V RNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する、請求項22記載のs i n A分子。

【請求項28】

アプテセンス鎖の21ヌクレオチドがH I V RNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する、請求項22記載のs i n A分子。

【請求項29】

アプテセンス鎖の5'末端が任意にリン酸基を含んでもよい、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項30】

アプテセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部がH I V RNAの5'-非翻訳領域のヌクレオチド配列またはその一部に相補的である、請求項1記載のs i n A分子。  
【請求項31】

アプテセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部が、すべてのH I VのRNA中に存在するH I V RNAのヌクレオチド配列またはその一部に相補的である、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項32】

許容しうる担体または希釈剤中に請求項1記載のs i n A分子を含む、医薬組成物。

【請求項33】

請求項1記載のs i n A分子を含む医薬品。

【請求項34】

請求項1記載のs i n A分子を含む活性成分。

【請求項35】

ヒト免疫不全ウイルス(H I V)の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸(s i n A)分子の使用であって、ここで、二本鎖s i n A分子の鎖の一方はH I V RNAのヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアプテセンス鎖であり、他方の鎖はアプテセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖s i n A分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大部分が糖修飾を含むことを特徴とする使用。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【技術分野】

【0001】

本発明は、McSwi ggen, 米国特許出願60/398, 036 (2002年7月23日出願), McSwi ggen, 米国特許出願10/225, 023 (2002年8月21日出願), McSwi ggen, 米国特許出願60/294, 140 (2001年5月29日出願) に基づく優先権を主張するMcSwi ggen, 米国特許出願10/157, 580 (2002年5月29日出願), McSwi ggen, 米国特許出願60/374, 722 (2002年4月22日出願), Beigelman, 米国特許出願60/358, 580 (2002年2月20日出願), Beigelman, 米国特許出願60/363, 124 (2002年3月11日出願), Beigelman, 米国特許出願60/386, 782 (2002年6月6日出願), Beigelman, 米国特許出願60/406, 784 (2002年8月29日出願), Beigelman, 米国特許出願60/408, 378 (2002年9月5日出願), Beigelman, 米国特許出願60/409, 293 (2002年9月9日出願), およびBeigelman, 米国特許出願60/440, 129 (2003年1月15日出願) に基づく優先権を主張する。これらの出願は、図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する。

【0002】

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)の遺伝子発現および/または活性の調節に応答する健康状態および疾病の研究、診断、および治療のための化合物、組成物、および方法に関する。本発明はまた、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)の発現および活性の経路に関連する遺伝子の発現および/または活性の調節に応答する健康状態および疾病に関連する化合物、組成物、および方法に関する。特に、本発明は、H I Vの遺伝子発現に対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる小核酸分子、例えば短干渉核酸(s i n A)、短干渉RNA(s i r n A)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、および短ヘアピンRNA(shRNA)分子に関連する。

【背景技術】

【0003】

以下はRNAiに関連する関連技術の説明である。この説明は、以下に記載される本発明を理解するためにのみ提供される。この概要は、以下に記載される研究のいずれかが本発明に対する先行技術であると認められるものではない。

【0004】

RNA干渉とは、動物において短干渉RNA(s i r n A)により媒介される配列特異

的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを表す (Fire et al., 1998, Nature, 391, 806)。植物における対応するプロセスは一般に転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと称され、真菌においてはクエンチンとも称される。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を防止するために用いられる進化的に保存された細胞防御メカニズムであると考えられており、異なる遊および門が共通して有している (Fire et al., 1999, Trends Genetics, 15, 358)。そのような外来遺伝子発現からの防御は、ウイルス感染または宿主ゲノム中へのトランスポゾン要素のランダムインテグレーションから生ずる二本鎖RNA (dsRNA) の生成にตอบสนองして、相同的一本鎖RNAまたはウイルスゲノムRNAを特異的に破壊する細胞応答により進化してきたのである。細胞におけるdsRNAの存在は、まだ完全には特性決定されていないメカニズムにより、RNAi応答を引き起こす。このメカニズムは、蛋白質キナーゼPKRおよび2', 5'-オリゴアデニレートシグナルのdsRNA媒介性活性化の結果リボヌクレアーゼIIによるmRNAの非特異的切断が生ずるインターフェロン応答とは異なるようである。

[00051]

細胞中に長いdsRNAが存在すると、ダイサーと称されるリボヌクレアーゼII酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNAをプロセスングして短干渉RNA (siRNA) として知られる短い断片のdsRNAにすることに関与している (Bernstein et al., 2001, Nature, 409, 363)。ダイサー活性から生ずる短干渉RNAは、典型的には約21-23ヌクレオチドの長さであり、約19塩基対のデュープレンクスを含む (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。ダイサーはまた、翻訳制御における関与が示唆されている保存された構造の前駆体RNAから21および22ヌクレオチドの小さな一時的RNA (sRNA) を切り出すことに関与することが示唆されている (Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi応答はまた、一般にRNA誘導性サイレンシング複合体 (RISC) と称されるエンボヌクレアーゼ複合体を特徴とし、これはsiRNAデュープレンクスのアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。機能的RNAの切断は、siRNAデュープレンクスのアンチセンス鎖に相補的な領域の中央部で生ずる (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。

[00061]

RNAiは種々の系で研究されてきた。Fireら (1998, Nature, 391, 806) は、C. Elegansにおいて最初にRNAiを観察した。WianneyおよびGoetz (1999, Nature Cell Biol., 2, 70) は、マウス胚においてdsRNAにより媒介されるRNAiを記載する。Hammondsら (2000, Nature, 404, 293) は、dsRNAでトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞におけるRNAiを記載する。Elbashirら (2001, Nature, 411, 494) は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞およびHeLa細胞において、合成の21ヌクレオチドRNAのデュープレンクスを導入することにより誘導されるRNAiを記載する。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究 (Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877) は、効率的なRNAi活性を媒介するために必須であるsiRNAの長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、21ヌクレオチドのsiRNAデュープレンクスは3' 末端ジヌクレオチドオーバーハングを含む場合に最も活性であることを示した。さらに、一方または両方のsiRNA鎖を2'-デオキシ (2'-H) または2'-オースチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が破壊されるが、3' 末端siRNAことは許容されることが示された。siRNAデュープレンクスの中心における単一のミスマッチ配列もまたRNAi活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、標的RNAにおける切断部位の位置はsiRNAガイド配列の3' 末端ではな

くガイド配列の5' 末端により規定されることを示した (Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。他の研究は、siRNAデュープレンクスの標的相補鎖の5'-リオン酸がsiRNA活性に必要であり、siRNAの5'-リオン酸成分を維持するためにATPが用いられることを示した (Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)。

[00071]

2ヌクレオチドの3'-オーバーハングを有する21-merのsiRNAデュープレンクスの3' 末端ヌクレオチドのオーバーハングしているセグメントをデオキシリボヌクレオチドで置き換えても、RNAi活性に有害な影響を有しないことが示されている。siRNAの各末端で4個までのヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドで置き換えることはよく許容されると報告されているが、デオキシリボヌクレオチドで完全に置換するとRNAi活性がなくなる (Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。さらに、Elbashirら (上掲) はまた、siRNAを2'-オースチルヌクレオチドで置換すると、RNAi活性が完全に破壊されたことを報告する。Lira (国際公開WO00/44914) およびBeachら (国際公開WO01/6836) は、siRNAがリソソーム様構造またはヌクレオチドのいずれかに結合またはイオノ複素原子の少なくとも一つを含むよう修飾することができるとを予備的に示唆する。しかし、いずれの出願も、siRNA分子においてそのような修飾がどの程度許容されるかを仮定しておらず、そのような修飾siRNAのそれ以上の指針または実例を提供していない。Kreutzlerら (カナダ特許出願2,359,180) もまた、dsRNAコンストラクトにおいて二本鎖RNA依存性蛋白質キナーゼPKRの活性化を妨げる目的で用いるためのある種の化学的修飾、特に2'-アミノまたは2'-オースチルヌクレオチド、および2'-Oまたは4'-Cメチレン架橋を含むヌクレオチドを記載する。しかし、Kreutzlerらも同様に、siRNA分子においてこれらの修飾がどの程度許容されるかについての実例または指針を提供していない。

[00081]

Parishら (2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087) は、C. elegansにおいて長い (>25nt) siRNA転写産物を用いてunc-22 遺伝子を標的とするある種の化学的修飾を試験した。著者らは、T7およびT3 RNAポリメラーゼによりチオリン酸ヌクレオチド類似体を取り込まれることによりこれらのsiRNA転写産物中にチオリン酸残基を導入すること、および2個のホスホロチオエーtert修飾塩基を有するRNAもRNAiとしての有効性を実質的に低下させたことを記載する。さらに、Parishらは、2残基より多いホスホロチオエーtert修飾は、干渉活性をアッセイすることができないほど大きくインビトロでRNAを不安定化させたことを報告する (同上, 1081)。著者らはまた、長いsiRNA転写産物中のヌクレオチド残基の2' 位におけるある種の修飾を試験して、リボヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換すると、特にウリジンからチミジンおよび/またはシチジンからデオキシシチジンへの置換の場合に、干渉活性が実質的に減少することを見いだした (同上)。さらに、著者らは、ある種の塩基修飾、例えば、siRNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖において、ウラシルの代わりに4-チオウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、および3'-アミノウラシル) ウラシル、およびグアニンの代わりにイノシンの置換を試験した。4-チオウラシルおよび5-ブロモウラシル置換は許容されたように見えたが、Parishは、イノシンはいずれの鎖に取り込まれたときにも干渉活性における実質的な減少を生じたことを報告している。Parishはまた、アンチセンス鎖における5-ヨードウラシルおよび3'-アミノウラシル) ウラシルの取り込みによっても、RNAi活性が実質的に減少したことを報告している。

[00091]

より長いdsRNAの使用が記載されている。例えば、Beachら (国際公開WO01/68836) は、内因性dsRNAを用いて遺伝子発現を弱めるための特定の方法を記載する。Tuschliら (国際公開WO01/75164) は、ショウジョウバエのイ

シトクロムRNAiシステム、およびある種の機能的な用途およびある種の治療用途に特定のsiRNA分子を用いることを記載する。しかし、Tuschli (2001, Chem. Biochem., 2, 239-245) は、インターフェロンの活性の危険性のため、遺伝的疾患またはウイルス感染を治療するためにRNAiを用いることができないことは疑わしいと述べている。Lira (国際公開WO00/44914) は、ある種の機能的な遺伝子の発現を弱めるために特定のdsRNAを用いることを記載する。Zernicka-Goetz (国際公開WO01/36646) は、ある種のdsRNA分子を用いて哺乳動物細胞において特定の遺伝子の発現を阻害するある種のの方法を記載する。Fire (国際公開WO99/32619) は、遺伝子発現の阻害に用いるためにある種のdsRNA分子を細胞内に導入するための特定のの方法を記載する。Piaellinck (国際公開WO00/01846) は、特定のdsRNA分子を用いて細胞において特定の表現型を与える原因である特定の遺伝子を同定するある種のの方法を記載する。Mellor (国際公開WO01/29058) は、dsRNA媒介性RNAiに關与する特定の遺伝子の同定を記載する。Deschamps Depailliet (国際公開WO99/07409) は、ある種の抗ウイルス剤と組み合わせた特定のdsRNA分子からなる特定の組成物を記載する。Waterhouse (国際公開99/53050) は、ある種のdsRNAを用いて植物細胞における核糖体の発現を減少させるある種のの方法を記載する。Driscoll (国際公開WO01/49844) は、標的の生物において遺伝子サイレンシングを促進するのに用いるための特定のDNAコンストラクトを記載する。

[0010]

他の者は、種々のRNAiおよび遺伝子サイレンシングシステムを報告している。例えば、Parish (2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087) は、C. elegansのunc-22遺伝子を標的とする特定の化学的に修飾されたsiRNAコンストラクトを記載する。Grossniklaus (国際公開WO01/38551) は、植物においてある種のdsRNAを用いてボロコム遺伝子発現を制御するためのある種のの方法を記載する。Churikov (国際公開WO01/42443) は、ある種のdsRNAを用いて生物の遺伝的特性を改変するある種のの方法を記載する。Cognigni (国際公開WO01/53475) は、Neurosporaのサイレンシング遺伝子を単離するある種のの方法およびその用途を記載する。Reed (国際公開WO01/68836) は、植物における遺伝子サイレンシングのある種のの方法を記載する。Honer (国際公開WO01/70944) は、ある種のdsRNAを用いてパーキンソン病のモデルとしてトランスジェニック線虫を用いる薬剤スクリーニングのある種のの方法を記載する。Deak (国際公開WO01/72774) は、ショウジョウバエにおけるRNAiに關連するかもしれないある種ののショウジョウバエ由来遺伝子産物を記載する。Arndt (国際公開WO01/92513) は、RNAiを増強する因子を用いて遺伝子抑制を媒介するある種のの方法を記載する。Tuschli (国際公開WO02/44321) は、ある種のの合成siRNAコンストラクトを記載する。Pachuk (国際公開WO00/63364) およびSatischandra (国際公開WO01/04313) は、ある種のdsRNAを用いてある種ののポリヌクレオチド配列の機能を阻害するためのある種のの方法および組成物を記載する。Echeverri (国際公開WO02/38805) は、RNAiにより同定されたある種ののC. elegans遺伝子を記載する。Kreutzer (国際公開WO02/055692, WO02/055693, およびEP144623B1) は、RNAiを用いて遺伝子発現を阻害するある種のの方法を記載する。Graham (国際公開WO99/49029 およびWO01/70949, およびAU4037501) は、ベクターから発現されるある種ののsiRNA分子を記載する。Fire (US6, 559) は、RNAiを媒介するある長さのdsRNA (25ヌクレオチドより長い) を用いてイントロで遺伝子発現を阻害するためのある種のの方法を記載する。

[0011]

後天性免疫不全症候群(AIDS)は、ヒト免疫不全ウイルス、例えば、HIV-1の感染により引き起こされると考えられている。Draetta (米国特許6,159,692, 5,972,704, 5,693,535, および国際公開WO93/23569 およびWO95/04818) は、HIVを標的とする酵素の核糖分子を記載する。Novina (2002, Nature Medicine, 8, 681-686) は、HIV-1感染を標的とするある種ののsiRNAコンストラクトを記載する。Lee (2002, Nature Biotechnology, 19, 500-505) は、HIV-1を標的とするある種ののsiRNAを記載する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

[0012]

発明の概要

本発明は、短干渉核糖酸(sRNA)分子を用いてRNA干渉(RNAi)により、遺伝子、例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染、および後天性免疫不全症候群(AIDS)の発現または維持に關連する遺伝子の発現を調節するのに有用な化合物、組成物および方法に關する。本発明はまた、小核糖分子、例えば、短干渉核糖酸(sRNA)、短干渉RNA(sRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)および短ヘプタペプチンRNA(shRNA)分子を用いて、RNA干渉(RNAi)により、HIV遺伝子、またはHIV経路に關与する遺伝子またはHIV活性に關する遺伝子の発現および活性を調節するのに有用な化合物、組成物、および方法に關する。特に、本発明は、HIV遺伝子の発現を調節するのに用いられる小核糖分子、例えば、短干渉核糖酸(sRNA)、短干渉RNA(sRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、および短ヘプタペプチンRNA(shRNA)分子および方法を提供する。本発明のsRNAは、修飾しなくてもよく、化学的に修飾してもよい。本発明のsRNAは、化学的に合成してもよく、ベクターから発現させてもよく、酵素的に合成してもよい。本発明はまた、RNA干渉(RNAi)により細胞におけるHIV遺伝子の発現または活性を調節する種々の化学的に修飾された合成短干渉核糖酸(sRNA)分子を提供する。化学的に修飾されたsRNAを使用することにより、インビボでのヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加、および/または細胞取り込みの改良のため、天然のsRNA分子の種々の特性が改良される。さらに、初期に発現された研究に反して、多くの化学的修飾を有するsRNAは、そのRNAi活性を保持している。本発明のsRNA分子は、種々の治療、診断、標的評価、ゲノム発見、遺伝子工学、およびフーダーマニクス用途に有用な試薬および方法を提供する。

[0013]

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の複製を阻害する二本鎖短干渉核糖酸(sRNA)分子を提供とし、二本鎖sRNA分子の一方の鎖は、HIV RNAのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列またはその一部を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。1つの態様においては、HIV RNAはHIV-1 RNAを含む。別の態様においては、HIV RNAはHIV-2 RNAを含む。

[0014]

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の複製を阻害する二本鎖短干渉核糖酸(sRNA)分子を提供とし、二本鎖sRNA分子の一方の鎖は、HIV RNAのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列またはその一部を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖sRNA分子中に存在する大部分のポリミジンスヌクレオチドは糖修飾を含む。1つの態様においては、二本鎖sRNA分子中に存在するすべてのポリミジンスヌクレオチドは糖修飾を含む。1つの態様においては、二本鎖sRNA分子の各鎖は約19-約29ヌクレオチドを含み、各鎖は他方の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19ヌクレオチドを含む。別の態様においては、二本鎖sRNA分子は2つ

のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられ、一方のフラグメントは s i n A 分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列を含み、第2のフラグメントは、s i n A 分子のセンス鎖のヌクレオチド配列を含む。さらに別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のセンス鎖は、リソカー分子、例えば、ポリヌクレオチドリソカーまたは非ヌクレオチドリソカーを介してアンチセンス鎖に連結されている。別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のセンス鎖中に存在する任意のポリミジンスケルオチド（すなわち、1またはそれ以上またはすべて）は 2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスケルオチドであり、センス領域中に存在する任意のポリヌクレオチド（すなわち、1またはそれ以上またはすべて）は 2'-デオキシポリヌクレオチドである。さらに別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のセンス鎖は 3' 末端および 5' 末端を含み、センス鎖の 5' 末端、3' 末端、または 5' 末端および 3' 末端の両方に末端キヤップ成分（例えば、反転デオキシ無極基成分）が存在する。別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のアンチセンス鎖は 1またはそれ以上の 2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスケルオチドおよび 1またはそれ以上の 2'-デオキシポリヌクレオチドを含む。さらに別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のアンチセンス鎖に存在する任意のポリミジンスケルオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスケルオチドであり、アンチセンス鎖に存在する任意のポリヌクレオチドは 2'-デオキシポリヌクレオチドである。別の態様においては、二本鎖 s i n A 分子のアンチセンス鎖はアンチセンス鎖の 3' 末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。さらに別の態様においては、アンチセンス鎖はアンチセンス鎖の 3' 末端にグリセリル修飾を含む。さらに別の態様においては、アンチセンス鎖の 5' 末端は任意にリン酸基を含む。

#### 【0015】

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、二本鎖 s i n A 分子の鎖の一方は HIV RNA のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列またはその一部を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖 s i n A 分子中に存在するポリミジンスケルオチドの大部分は錯修飾を含み、前記 s i n A 分子の2つの鎖のそれぞれは 21ヌクレオチドを含む。1つの態様においては、アンチセンス鎖の 21ヌクレオチドが HIV RNA のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する。別の態様においては、アンチセンス鎖の約 19ヌクレオチドが HIV RNA のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成する。1つの態様においては、s i n A 分子の各鎖は、s i n A 分子の他方の鎖の相補的なヌクレオチドと塩基対形成する。別の態様においては、s i n A 分子の各鎖の約 19ヌクレオチドは s i n A 分子の他方の鎖の相補的なヌクレオチドと塩基対形成し、s i n A 分子の各鎖の少なくとも2つの 3' 末端ヌクレオチドは s i n A 分子の他方の鎖のヌクレオチドと塩基対形成しない。1つの態様においては、s i n A 分子の各鎖の塩基対形成していない2つの 3' 末端ヌクレオチドのそれぞれは、2'-デオキシ-2'-ポリミジン、例えば、2'-デオキシチミジンである。

#### 【0016】

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、二本鎖 s i n A 分子の鎖の一方は HIV RNA のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列またはその一部を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖 s i n A 分子中に存在するポリミジンスケルオチドの大部分は錯修飾を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部は HIV RNA の 5' -非翻訳領域のヌクレオチド配列またはその一部に相補的である。

#### 【0017】

別の態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、二本鎖 s i n A 分子の鎖の一方は HIV RNA のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列またはその一部を含むアンチセン

ス鎖であり、他方の鎖はアンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖 s i n A 分子中に存在するポリミジンスケルオチドの大部分は錯修飾を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部は、すべての HIV の RNA 中に存在する HIV RNA のヌクレオチド配列に相補的である。

#### 【0018】

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、二本鎖 s i n A 分子の一方の鎖は HIV 蛋白質またはそのフラグメントをコードする RNA のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。1つの態様においては、二本鎖 s i n A 分子中に存在するポリミジンスケルオチドの大部分は錯修飾を含む。

#### 【0019】

1つの態様においては、本発明の s i n A 分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列またはその一部は、すべての HIV 株の RNA に存在する HIV RNA のヌクレオチド配列またはその一部に相補的である。

#### 【0020】

1つの態様においては、本発明は、本発明の s i n A 分子を、許容しうる担体または希釈剤中に含む医薬組成物を特徴とする。

#### 【0021】

1つの態様においては、本発明は、本発明の s i n A 分子を含む医薬品を特徴とする。

#### 【0022】

1つの態様においては、本発明は、本発明の s i n A 分子を含む活性成分を特徴とする。

#### 【0023】

1つの態様においては、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の複製を阻害する二本鎖短干渉核酸（s i n A）分子の使用を特徴とし、前記二本鎖 s i n A 分子の一方の鎖は HIV RNA のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、前記二本鎖 s i n A 分子中に存在するポリミジンスケルオチドの大部分は錯修飾を含む。

#### 【0024】

1つの態様においては、本発明は、独立してまたは組み合わせて、HIV および/または HIV ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を調節する 1またはそれ以上の s i n A 分子および方法を特徴とする。特に、本発明は、HIV、例えば、HIV-1、HIV-2、および関連するウイルス、例えば、FIV-1 および STV-1；または特定の HIV 遺伝子、例えば、LTR、nef、vif、tat、または rev の発現を調節する s i n A 分子を特徴とする。特定の態様においては、本発明は、HIV-1 をコードする遺伝子、例えば Genbank 受託番号 AJ302647；HIV-2 遺伝子、例えば Genbank 受託番号 NC\_001722；FIV-1、例えば Genbank 受託番号 NC\_001482；STV-1、例えば Genbank 受託番号 M66437；LTR、例えば Genbank 受託番号 AJ302647 に含まれるもの；nef、例えば Genbank 受託番号 AJ302647 に含まれるもの；vif、例えば Genbank 受託番号 AJ302647 に含まれるもの；tat、例えば Genbank 受託番号 AJ302647 に含まれるもの；および rev、例えば Genbank 受託番号 AJ302647 に含まれるものの発現を調節する、核酸に基づく分子および方法を特徴とする。

#### 【0025】

別の態様においては、本発明は、独立してまたは組み合わせて、HIV-1 のエンベローム糖蛋白質（env、例えば、Genbank 受託番号 NC\_001802）をコードする遺伝子の発現を調節する、例えば、HIV-1 の CD4 レセプター媒介性融合を阻害する 1またはそれ以上の s i n A 分子および方法を特徴とする。特に、本発明は、HIV





のRNAに相補的な配列、例えば、Genbank受託番号NC\_001722の配列を含む。別の態様においては、本発明は、FIV-1RNAに対するRNAi活性を有するsina分子を特徴とし、sina分子は、FIV-1のコーディング配列を有する任意のRNAに相補的な配列、例えば、Genbank受託番号NC\_001482の配列を含む。別の態様においては、本発明は、SIV-1RNAに対するRNAi活性を有するsina分子を特徴とし、sina分子は、SIV-1のコーディング配列を有する任意のRNAに相補的な配列、例えばGenbank受託番号M66437の配列を含む。

[0035]

さらに別の態様においては、本発明は、Genbank受託番号AJ302647 (HIV-1), NC\_001722 (HIV-2), NC\_001482 (FIV-1) および/またはM66437 (SIV-1) を含む配列に相補的な配列を含むsina分子を特徴とする。

[0036]

以下に、例示的HIV-1遺伝子(HIVと称される)を参照して、種々の観点および態様を説明する。しかし、そのような参照は例示のためのみであることを意味し、本明細書に記載される種々の観点および態様はまた、HIVポリペプチドおよび/またはHIVに類似するウイルスのポリペプチドをコードする他の遺伝子、ならびにHIVの細胞標的、例えば本明細書に記載されるものにも向けられていて、種々の観点および態様はまた、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染および後天性免疫不全症候群(AIDS)の進行、発達、または維持に關与する他の遺伝子にも向けられていて、これらの追加の遺伝子は、本明細書においてHIVについて説明されている方法を用いて、標的的部位について分析することができ、すなわち、他の遺伝子の阻害およびそのような阻害の効果は、本明細書に記載されるようにして実施することができ、したがって、本明細書において以下に定義され、記載される態様において引用される"HIV"との用語は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の感染および後天性免疫不全症候群(AIDS)の発達または維持に關連する遺伝子、例えば、HIVポリペプチド、および/またはHIV遺伝子に類似するウイルスのポリペプチドをコードする遺伝子、ならびに遺伝子発現のHIV経路および/またはHIV活性に關与する細胞性遺伝子も包含することを意味する。また、本明細書において以下に定義され、記載される態様において引用される"HIV"との用語は、HIV感染に關与するHIVウイルス遺伝子産物および細胞遺伝子産物、例えば本明細書において記載されるものを包含することを意味する。すなわち、本明細書において"HIV"との用語を参照して記載されるそれぞれの態様は、本明細書において定義される"HIV"との用語によりカバーされるすべてのウイルス、細胞性およびウイルス性蛋白質、ペプチド、ポリペプチド、および/またはポリヌクレオチド分子について適用可能である。

[0037]

HIVゲノムの高い配列変異性のため、広い治療用途のためのsina分子の選択には、HIVゲノムの保存領域が含まれるであろう。特に、本発明は、HIVゲノムの保存領域を切断する核酸分子を記載する。したがって、HIVの異なる単離物のすべてを標的とするようsina分子を設計することができる。種々のHIV単離物の保存領域を標的とするよう設計されたsina分子は、様々な患者集団においてHIV複製の有効な阻害が可能とし、HIVゲノムの非保存領域における変異により進化するHIVの感染に対するsina分子の有効性を確実にすることができる。したがって、HIVの保存ヌクレオチド配列と相互作用するようsina分子を設計することにより、1つのsina分子をHIVのすべての単離物に対してターゲティングさせることができる(そのような保存配列はすべてのHIV単離物のRNAに存在すると予測される)。

[0038]

1つの態様においては、本発明はHIV遺伝子の発現をダウンレギュレートするsina分子を特徴とし、HIV遺伝子はHIVをコードする配列を含む。

[0039]

1つの態様においては、本発明は、HIV RNAに対するRNAi活性を有するsina

NA分子を特徴とし、sina分子は、HIVまたは他のコーディング配列、例えば、本明細書に開示されるGenbank受託番号を有する例示的配列を有する任意のRNAに相補的な配列を含む。表I I IおよびI Vに示されるかまたは本明細書に記載される化学的修飾を本発明の任意のsinaコンストラクトに適用することができる。

[0040]

別の態様においては、本発明は、HIV遺伝子またはHIV感染およびAIDSに關与する関連遺伝子に対するRNAi活性を有するsina分子を特徴とし、sina分子は、そのような遺伝子のヌクレオチド配列、例えば、本明細書に開示されるGenbank受託番号を有する例示的配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様においては、本発明のsina分子は、HIV遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用してHIV遺伝子発現のサイレンシングを媒介することができ、ヌクレオチド配列を含み、例えば、sinaは、HIV遺伝子のクロマチン構造を変化させてHIV遺伝子の転写を防止する細胞プロセスによりHIV遺伝子発現の制御を媒介する。

[0041]

別の態様においては、本発明は、HIV遺伝子のヌクレオチド配列または配列の一部に相補的なヌクレオチド配列、例えばsina分子のアンチセンス領域中のヌクレオチド配列を含むsina分子を特徴とする。別の態様においては、HIV遺伝子配列を含む配列または配列の一部に相補的な領域、例えばsinaコンストラクトのアンチセンス領域を含むsina分子を特徴とする。

[0042]

1つの態様においては、HIV sinaコンストラクトのアンチセンス領域は配列番号1-738または1477-1482のいずれかを有する配列に相補的な配列を含むことができる。1つの態様においては、アンチセンス領域はまた、配列番号739-1477、1491-1498、1507-1514、1523-1530、1535-1538、1547-1554、1557-1558、1567-1574、1595、1597、1599、1601、1603、または1604のいずれかを有する配列を含むことができる。別の態様においては、HIVコンストラクトのアンチセンス領域は、配列番号1-738、1477-1490、1499-1506、1515-1522、1531-1534、1539-1546、1555-1556、1559-1566、1575-1576、1594、1596、1598、1598、1600、または1602のいずれかを有する配列を含むことができる。アンチセンス領域は配列番号1583の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1584の配列を含むことができる。アンチセンス領域は配列番号1585の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1586の配列を含むことができる。アンチセンス領域は配列番号1587の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1588の配列を含むことができる。アンチセンス領域は配列番号1590の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1591の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1592の配列を含むことができる。アンチセンス領域は配列番号1589の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号1593の配列を含むことができる。

[0043]

1つの態様においては、本発明のsina分子は配列番号1-1604のいずれかを有する。配列番号1-1604に示される配列は限定ではない。本発明のsina分子は任意の連続するHIV配列(例えば、約19-約25個、または約19、20、21、22、23、24または25個の連続するHIVヌクレオチド)を含むことができる。

[0044]

さらに別の態様においては、本発明は、本明細書に開示されるGenbank受託番号により表される配列を含む配列または配列の一部に相補的な配列、例えばsinaコンストラクトのアンチセンス配列を含むsina分子を特徴とする。表I I IおよびI Vに示され、本明細書に記載される化学的修飾を、本発明の任意のsinaコンストラクトに適用することができる。

【0045】  
本発明の1つの態様においては、s i N A分子は約19—約29ヌクレオチドを有するア  
ンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、H I V蛋白質をコードするR N A配列に相補的  
であり、前記s i N Aはさらに、約19—約29（例えば、約19、20、21、22、  
23、24、25、26、27、28または29）ヌクレオチドを有するセンス鎖を含み  
、前記センス鎖および前記アンチセンス鎖は、少なくとも約19の相補的ヌクレオチドを  
有する別々のヌクレオチド配列である。

本発明の別の態様においては、本発明の s1NA 分子は、約 199—約 229 (例えば、約 199, 200, 201, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 または 229) ヌクレオチドを有するアプテセンス領域を含む、アプテセンス領域は、H1V 蛋白質をコードする R1NA 配列に相補的であり、前記 s1NA はさらに、約 199—約 229 ヌクレオチドを有する R1NA センテ領域を含み、前記 s1NA センテ領域および前記アプテセンス領域は、少なくとも約 19 個の相補的ヌクレオチドを有する直鎖状分子を含む。

本発明の1つの態様においては、sIN A分子はH1V蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアプテセンス鎖を含む。sIN Aはさらにセンス鎖を含み、前記センス鎖は、H1V遺伝子またはその一部のヌクレオチド配列を含む。

別の様様においては、 $sIN\Delta$ 分子は、 $HIV$ 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含む。 $sIN\Delta$ 分子はさらにセンス領域を含み、前記センス領域は $HIV$ 遺伝子またはその一部のヌクレオチド配列を含む。

1 つの態様においては、本発明の s i N A 分子は、H I V 遺伝子によりコードされる R N A の発現を調節する R N A i 活性を有する。H I V 遺伝子は互いにある程度の配列ホモロジーを共有することができると、s i N A 分子は、種々の H I V 標的の間で共有されている配列を選択することにより一群の H I V 遺伝子（および関連するシエンチアまたはリガンド遺伝子）を標的とするように、あるいは、特定の H I V 標的にユニークな配列を選択することにより特定の H I V 遺伝子を選択するように、設計することができる。したがって、1 つの態様においては、s i N A 分子は、1 つの s i N A 分子でいくつかの H I V 遺伝子（例えば、異なる H I V 株、サブタイプ/変種、変異体遺伝子等）を標的にするようになる。いくつかの H I V 遺伝子の間でホモロジーを有する H I V R N A 配列の例と存在領域を標的とするよう設計することができる。別の態様においては、s i N A 分子が R N A i 活性を媒介するために必要とされる高度の特異性のため、s i N A 分子は、特定の H I V R N A 配列にユニークな配列を標的とするよう設計することができる。

1 つの態様においては、RNA 干渉による遺伝子サイレンシング応答のメダイエータとして作用する本発明の核酸分子は二本鎖核酸分子である。別の態様においては、本発明の sRNA 分子は、約 19 - 約 25 (例えば、約 19, 20, 21, 22, 23, 24 または 25)ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの間に約 19 塩基対を含むデュアルストラクタから構成される。さらに別の態様においては、本発明の sRNA 分子は、約 1 - 約 3 (例えば、約 1, 2, または 3)ヌクレオチドの、本発明の sRNA 末端を有するデュアルストラクタ、例えば、約 19 塩基対を有し、3'末端モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、またはトリヌクレオチドオーバーハングを有する約 21ヌクレオチドのデュアルストラクタを含む。

【0051】  
 1つの懸链においては、本発明は、HIVを発現する核酸分子、例えばHIV蛋白質をコードするRNAに対する特異性を有する、1またはそれ以上の化学的に修飾されたsi

N A コ ン ス ト ラ ク ト を 待 徴 と す る 。 そ の よ う な 化 学 的 修 飾 の 非 限 定 的 例 に は 、 限 定 さ れ な  
 い が 、 ホ ス ホ ロ チ オ エ ー ト ス ク レ し オ チ ド 間 結 合 、 2'-デ オ キ シ リ ボ ス ク レ し オ チ ド 、 2'-  
 -O-メ チ ル リ ボ ス ク レ し オ チ ド 、 2'-デ オ キ シ -2'-ウ ル シ オ リ ボ ス ク レ し オ チ ド 、  
 万 能 塩 基 "ス ク レ し オ チ ド"、"非 常 状"ス ク レ し オ チ ド 、 5'-C-メ チ ル "ス ク レ し オ チ ド"、 お よ び  
 末 端 グ リ セ リ ル お よ び / ま た は 反 転 デ ギ キ シ 無 塩 基 残 基 の 取 り 込 み が 含 ま れ る 。 こ れ ら の  
 化 学 的 修 飾 は 、 種 々 の N A コ ン ス ト ラ ク ト 中 で 用 い た 場 合 、 細 胞 に お い て R N A の 活  
 性 を 保 ち 、 同 時 に 、 こ れ ら の 化 合 物 の 血 清 安 定 性 を 劇 的 に 増 加 さ せ る こ と が 示 さ れ て い る  
 。 さ ら に 、 P a r i s h a (上 掲) に よ り 公 表 さ れ た デ ー タ に 反 し て 、 本 発 明 に お い て  
 は 、 多 数 (2 以 上) の ホ ス ホ ロ チ オ エ ー ト 鹽 酸 が 充 分 に 許 容 さ れ 、 修 飾 s i n A コ ン ス ト  
 ラ ク ト の 血 清 安 定 性 を 実 質 的 に 増 加 さ せ る こ と が 示 さ れ る 。

1 つの態様においては、本発明の s i n A 分子は、R N A i を媒介する能力を維持しながら、修飾ヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドを用いて、インビトロまたはインビボでの特性、例えば安定性、活性、および/または生物利用性を改良することができる。例えば、本発明の s i n A 分子は、s i n A 中に存在するヌクレオチドの総数のパーセントとして修飾ヌクレオチドを含むことができる。すなわち、本発明の s i n A 分子は、一般に、約 5% - 約 100% の修飾ヌクレオチド（例えば、5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% または 100% の修飾ヌクレオチド）を含むことができる。所定の s i n A 分子中に存在する修飾ヌクレオチドの実際のパーセントは、s i n A 中に存在するヌクレオチドの総数によって異なるであろう。s i n A 分子が一本鎖である場合、修飾のパーセントは一本鎖 s i n A 分子中に存在するヌクレオチドの総数に基づくことができる。同様に、s i n A 分子が二本鎖である場合、修飾のパーセントは、セツウ鎖、アンチセツウ鎖、またはセツウ鎖およびアンチセツウ鎖の両方に存在するヌクレオチドの総数に基づくことができる。

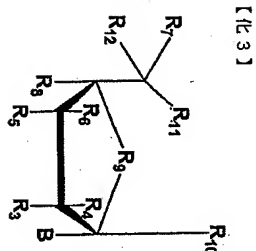
非限定的例においては、核酸分子中に化学的に修飾されたヌクレオチドを導入することは、外的にポリバリールされる天然のRNA分子に固有の、インヒビト性安定性および生物利用性の潜在的な制限を解消する有力な道具を提供する。例えば、化学的に修飾された核酸分子を用いることでより長い半減期を有する傾向にあるため、化学的に修飾された核酸分子を用いることにより、所定の治療効果に必要な特定の核酸分子の投与量を低下させることができる。さらに、ある種の化学的修飾は、特定の細胞または組織を標的とすることにより、および／または核酸分子の細胞取り込みを改良することにより、核酸分子の生物利用性を改良することができる。したがって、化学的に修飾された核酸分子の活性が、天然の核酸分子と比較して、例えば、全RNA核酸分子と比較したときに低いとしても、分子の改良された安定性および／またはポリバリールのため、修飾核酸分子の全体的活性は天然の分子より高い可能性がある。天然の非修飾sRNAとは異なり、化学的に修飾されたsRNAはまた、ヒトにおいてインターフェロン活性を活性化することができる。

【00.054】  
本発明の  $\text{SiNA}$  分子のアンチセンス領域は、前記アンチセンス領域の3'末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。アンチセンス領域は、前記アンチセンス領域の5'末端に約1〜約5個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。本発明の  $\text{SiNA}$  分子の3'末端ヌクレオチドおよびバーハンジは、核糖の糖、塩基、または骨格で化学的に修飾されたりホスホロチオエートまたはデオキシリボスヌクレオチドを含むことができる。3'末端ヌクレオチドおよびバーハンジは、1またはそれ以上の万能塩基リボスホロチオエートを含むことができる。3'末端ヌクレオチドおよびバーハンジは、1またはそれ以上の非環状ヌクレオチドを含むことができる。

【0055】  
本発明の１つの態様は、本発明の少なくとも１つのs i N A分子をコードする核酸配列







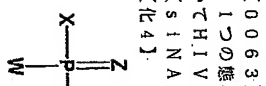
【式中、  
各R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R11およびR12は、独立して、H, OH, アルキル、置換アルキル、アルカールまたはアラルキル、F, Cl, Br, C, N, CF3, OCF3, OCN, オールキル、S-アルキル、N-アルキル、O-アルキル、S-アルケニル、N-アルケニル、SO-アルキル、アルキル-OSH, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO2, NO2, N3, NH2, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアルケニル, ヘテロシクロアルキル, ヘテロシクロアルカール, オートミノ酸, オートアミノアルキル, ヘテロシクロアルカール, アミノアルキル, ポリアルキルアミノ, 置換シリル, または式Iを有する基であり、R9は、O, S, CH2, S=O, CHF, またはCF2であり、Bは、スクレオシド塩基、例えば、アデニン, グアニン, ウラシル, シトシン, チミン, 2-アミノアデニン, 5-メチルシトシン, 2, 6-ジアミノアデニン, または他のRNAに相補的であつても相補的でないように用いることができる他の任意の天然に生じない塩基、または非スクレオシド塩基、例えば、フェニル, ナフチル, 3-ニトロピロール, 5-ニトロインドール, ネプタリン, ピリジン, ピリゾリン, または他のRNAに相補的であつても相補的でないように他の任意の天然に生じない万能塩基である】  
を有する1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）のスクレオチドまたは非スクレオチドを含む。

【0061】

式Iの化学的に修飾されたスクレオチドまたは非スクレオチドは、sINAデュープレックスの一方または両方のオリゴスクレオチド鎖に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明のsINA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に、1またはそれ以上の式Iの化学的に修飾されたスクレオチドまたは非スクレオチドを含むことができる。例えば、本発明の例示的sINA分子は、センス鎖、または両方の鎖の5'末端に、約1-約5個またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上）の式Iの化学的に修飾されたスクレオチドまたは非スクレオチドを含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的sINA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端に、約1-約5個またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上）の式Iの化学的に修飾されたスクレオチドまたは非スクレオチドを含むことができる。

【0062】

別の態様においては、本発明のsINA分子は、式IまたはIを有するスクレオチドを含み、ここで、式IまたはIを有するスクレオチドは反転のコグニグエーションである。例えば、式IまたはIを有するスクレオチドは、sINAコンストラクトに3'-3', 3'-2', 2'-3', または5'-5'コグニグエーションで、例えば、sINA鎖の一方または両方の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に結合させることができる。



【0063】  
1つの態様においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系に存在してHIVに結合するRNA干渉（RNAi）を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸（sINA）分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式I V:

【式中、  
各XおよびYは、独立して、O, S, N, アルキル、置換アルキル、またはアルキルハロであり；各ZおよびWは、独立して、O, S, N, アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカール、アラルキル、またはアルキルハロであり；W, X, YおよびZはすべてOではない】  
を有する5'末端リン酸基を含む。

【0064】

1つの態様においては、本発明は、他の一相補的鎖、例えば、他のRNAに相補的な鎖に式I Vを有する5'末端リン酸基を有するsINA分子を特徴とし、ここで、sINA分子は、全RNA sINA分子を含む。別の態様においては、本発明は、他の一相補的鎖に式I Vを有する5'末端リン酸基を有するsINA分子を特徴とし、ここで、sINA分子はまた、一方または両方の鎖の3'末端に約1-約4個（例えば、約1, 2, 3, または4個）のデオキシリボスクレオチドを有する、約1-約3（例えば、約1, 2, または3）スクレオチドの3'末端スクレオチドを含む。別の態様においては、式I Vを有する5'末端リン酸基は、本発明のsINA分子、例えば式I-VIのいずれかを有する化学的修飾を有するsINA分子の他の一相補的鎖に存在する。

【0065】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系に存在してHIVに結合するRNA干渉（RNAi）を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸（sINA）分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は1またはそれ以上のホスホロチオエートスクレオチド間結合を含む。例えば、非限定的例においては、本発明は、一方のsINA鎖に約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8個またはそれ以上のホスホロチオエートスクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸（sINA）を特徴とする。さらに別の態様においては、本発明は、両方のsINA鎖に独立して約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8個またはそれ以上のホスホロチオエートスクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸（sINA）を特徴とする。ホスホロチオエートスクレオチド間結合は、sINAデュープレックスのオリゴスクレオチド鎖の一方または両方に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明のsINA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に1またはそれ以上のホスホロチオエートスクレオチド間結合を含むことができる。例えば、本発明の例示的sINA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'末端に、約1-約5個またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6個またはそれ以上）の連続するホスホロチオエートスクレオチド間結合を含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的sINA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）のピリミジンホスホロチオエートスクレオチド間結合を含むことができる。さらに別の非限定的例においては、本発明の例示的sINA分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、1またはそれ以上のプリンホスホロチオ

エートヌクスレオチド間結合を含むことができる。

199001

1 つの態様においては、本発明は、セツン鎖が 1 またはそれ以上、例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクロレオチド間結合、および/または 1 またはそれ以上 (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上) の 2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, 2'-デオキシ-, 2'-フルオロ-, および/または 1 またはそれ以上の (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上) の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセツン鎖の 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に末端キヤップ分子を含み; かつ、アプチセツン鎖が約 1-約 10 個またはそれ以上、特に約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または 1 またはそれ以上 (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上) の 2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, 2'-デオキシ-, 2'-フルオロ-, および/または 1 またはそれ以上 (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上) の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアプチセツン鎖の 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に末端キヤップ分子を含む s i n A 分子を特徴とする。別の態様においては、セツンおよび/またはアプチセツン s i n A 鎖の 1 またはそれ以上の、例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上のポリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-, 2'-O-メチル-, および/または 2'-デオキシ-, 2'-フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており、同じまたは異なる鎖に存在する、1 またはそれ以上の、例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に末端キヤップ分子を有しているも有していないくてもよい。

【0067】

別の様様においては、本発明は、センス鎖が約1—約5個、特に約1, 2, 3, 4, または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-オ-メチル-, 2'-デオキシ-2'-フルオロ、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセンス鎖の3'末端, 5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を含み、かつ、フンチセンス鎖が約1—約5個またはそれ以上、特に約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-オ-メチル-, 2'-デオキシ-2'-フルオロ、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアンチセンス鎖の3'末端, 5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を含むヌクレオチド分子を特徴とする。別の様様においては、センスおよび/またはアンチセンスs i n A鎖の1またはそれ以上、例えば約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のポリミジヌクレオチドは、2'-デオキシ-, 2'-オ-メチルおよび/または2'-デオキシ-, 2'-フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており、同じまたは異なる鎖に存在する、約1—約5個またはそれ以上、例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または3'末端, 5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キヤップ分子を有しているも有してなくともよい。

189001

一つの態様においては、本発明は、アクチセンス鎖が1またはそれ以上、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および／または約1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-メトキ-, 2'-アセト-

オキシ-2-ニールオロ、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセリン鎖の3'末端、5'末端、または3'末端の両方に末端キヤップ分子を含み、かつ、アプタセリン鎖が約1-約10個またはそれ以上、特に約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2'-デオキシ-, 2'-オメガチル-, 2'-デオキシ-, 2'-ニールオロ、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアプタセリン鎖の3'末端、5'末端、または3'末端の両方に末端キヤップ分子を含むヌクレオチド分子を特徴とする。別の態様においては、セリンおよび/またはアプタセリンヌクレオチドの1またはそれ以上、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のリボリボヌクレオチドは、2'-デオキシ-, 2'-オメガチル、および/または2'-デオキシ-, 2'-ニールオロヌクレオチドで化学的に修飾されておき、同じまたは異なる鎖に存在する1またはそれ以上、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または3'末端、5'末端、または3'末端の両方に末端キヤップ分子を有していても有していなくてもよい。

【6900】

別の態様においては、本発明は、アジセツス鎖が約1—約5個またはそれ以上、特に約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエトキシアルキルオチド間結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2—デオキシ、2—オ—メチル、2—デオキシ—2—フルオリオ、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾スクラロチドを含み、任意にセツス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キヤツフ分子を含み、かつ、アジセツス鎖が約1—約5個またはそれ以上、特に約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエトキシアルキルオチド間結合、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の2—デオキシ、2—オ—メチル、2—デオキシ—2—フルオリオ、および/または1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の万能塩基修飾スクラロチドを含み、任意にアジセツス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キヤツフ分子を含む、s i N A分子を特徴とする。別の態様においては、セツスおよび/またはアジセツス s i N A鎖の1またはそれ以上、例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上のトリジンスクラロチドは、2—デオキシ、2—オ—メチルおよび/または2—デオキシ—2—フルオリオスクラロチドで化学的に修飾されており、同じ鎖または異なる鎖に存在する約1—約5個、例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエトキシアルキルオチド間結合、および/または、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に末端キヤツフ分子を有しているも有していなくてもよい。

【0070】

1つの態様においては、 $\text{SiNA}$ 分子の各鎖に約1〜約5個、特に約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する、化学的に修飾された短干渉核酸 ( $\text{SiNA}$ ) 分子を特徴とする。

【0071】

別の態様においては、本発明は、2'-5'ヌクレオチド間結合を含むsINA分子を、特微とする。2'-5'ヌクレオチド間結合は、sINA配列鎖の一方または両方の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在することができ、さらには、2'-5'ヌクレオチド間結合は、sINA配列鎖の一方または両方の種々の他の位置に存在することができ、例えば、sINA分子の一方または両方の鎖のポリミジンスケル

オチドの約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上, 例えばすべてのヌクレオチド間結合は, 2'-5'ヌクレオチド間結合を含むことができ, またはs i N A分子の一方または両方の鎖のプリンスケレオチドの約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上, 例えばすべてのヌクレオチド間結合は, 2'-5'ヌクレオチド間結合を含むことができる。

#### [0072]

別の態様においては, 本発明の化学的に修飾されたs i N A分子は, 2つの鎖を有するデュープレックスを含み, この一方または両方を化学的に修飾することができ, 各鎖は約18-約27 (例えば, 約18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, または27)ヌクレオチドの長さであり, デュープレックスは約18-約23 (例えば, 約18, 19, 20, 21, 22, または23)塩基対を有し, 化学的修飾は, 式I-VIのいずれかを有する構造を含む。例えば, 本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は2つの鎖を有するデュープレックスを含み, この一方または両方は式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾されていてもよく, 各鎖は約21ヌクレオチドからなり, それぞれは2ヌクレオチドの3'末端ヌクレオチド-パーハングを有し, デュープレックスは約19塩基対を有する。別の態様においては, 本発明のs i N A分子は一本鎖ヘアピン構造を有し, ここで, s i N Aは約36-約70 (例えば, 約36, 40, 45, 50, 55, 60, 65, または70)ヌクレオチドの長さであり, 約18-約23 (例えば, 約18, 19, 20, 21, 22, または23)塩基対を有し, s i N Aは式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する構造を含むことができる。例えば, 本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は, 式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された, 約42-約50 (例えば, 約42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, または50)ヌクレオチドを有する直鎖状オリゴヌクレオチドを含み, ここで, 直鎖状オリゴヌクレオチドは約19塩基対および2ヌクレオチドの3'末端ヌクレオチド-パーハングを有するヘアピン構造を形成する。別の態様においては, 本発明の直鎖状ヘアピンs i N A分子はスチムル-レスモーターを含み, ここで, s i N A分子のルーア部分は生物分解性である。例えば, 本発明の直鎖状ヘアピンs i N A分子は, s i N A分子のルーア部分のインデボでの分解により3'末端パーハング, 例えば約2ヌクレオチドを含む3'末端ヌクレオチド-パーハングを有する二本鎖s i N A分子が生成されるように設計される。

20

#### [0073]

別の態様においては, 本発明のs i N A分子は環状核酸分子を含み, ここで, s i N Aは約38-約70 (例えば, 約38, 40, 45, 50, 55, 60, 65, または70)ヌクレオチドの長さであり, 約18-約23 (例えば, 約18, 19, 20, 21, 22, または23)塩基対を有し, s i N Aは化学的修飾を含むことができ, これは式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する構造を含む。例えば, 本発明の化学的に修飾された例示的なs i N A分子は, 式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された約42-約50 (例えば, 約42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, または50)ヌクレオチドを有する環状オリゴヌクレオチドを含み, 環状オリゴヌクレオチドは約19塩基対および2個のルーアを有するダンベル形状の構造を形成する。

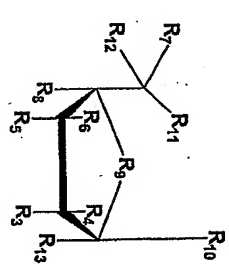
#### [0074]

別の態様においては, 本発明の環状s i N A分子は, 2つのルーアモーターを含み, ここで, s i N A分子のルーア部分の一方または両方は生物分解性である。例えば, 本発明の環状s i N A分子は, s i N A分子のルーア部分のインデボでの分解により, 3'末端パーハング, 例えば約2ヌクレオチドを含む3'末端ヌクレオチド-パーハングを有する二本鎖s i N A分子が生成するように設計される。

#### [0075]

1つの態様においては, 本発明のs i N A分子は, 少なくとも1つ (例えば, 約1, 2

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)の無塩基成分, 例えば, 式V: [化5]

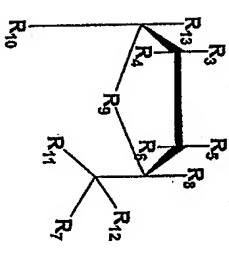


式中, 各R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R11, R12, およびR13は, 独立して, H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカールまたはアラキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-OS, H, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO2, N, O2, N3, NH2, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, ONH2, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, または式Iを有する基であり; R9は, O, S, CH2, S=O, CHF, またはCF2である]

[0076]

1つの態様においては, 本発明のs i N A分子は, 少なくとも1つ (例えば, 約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)の反転無塩基成分, 例えば, 式VI:

[化6]



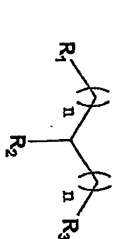
式中, 各R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R11, R12, およびR13は, 独立して, H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカールまたはアラキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, OCN, O-アルキル, S-アルキル, N-アルキル, O-アルケニル, S-アルケニル, N-アルケニル, SO-アルキル, アルキル-OS, H, アルキル-OH, O-アルキル-OH, O-アルキル-SH, S-アルキル-OH, S-アルキル-SH, アルキル-S-アルキル, アルキル-O-アルキル, ONO2, N, O2, N3, NH2, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, ONH2, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, または式Iを有する基であり; R9は, O, S, CH2, S=O, CHF, またはCF2であり, R2, R

3, R 8 または R 1 3 のいずれかは、本発明の s i n A 分子への結合の点として働く〕を有する化合物を含む。

【0077】

別の態様においては、本発明の s i n A 分子は、少なくとも1つ（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個、またはそれ以上）の置換ポリアルキル成分、例えば、式V11:

【化7】



【式中、各nは、独立して、1-12の整数であり、各R1, R2およびR3は、独立して、H, OH, アルキル、置換アルキル、アルカールまたはアラルキル、F, Cl, B, CN, C F3, O C F3, O C N, O-アルキル、S-アルキル、N-アルキル、O-アルケニル、S-アルケニル、N-アルケニル、SO-アルキル、アルキル-O S H; アルキル-O H, O-アルキル-O H, O-アルキル-S H, S-アルキル-O H, S-アルキル-S H, アルキル-S-アルキル、アルキル-O-アルキル, O N O2, N O2, N3, N H2, アミノアルキル, アミノ酸, アミノアシル, O N H2, O-アミノアルキル, O-アミノ酸, O-アミノアシル, ヘテロシクロアルキル, ヘテロシクロアルカール, アミノアルキルアミノ, ポリアルキルアミノ, 置換シリル、または式Iを有する基であり、R1, R2またはR3は、本発明の s i n A 分子への結合の点として働く】を有する化合物を含む。

【0078】

別の態様においては、本発明は、R1およびR2はヒドロキシル (OH) 基であり、nは1であり、R3はOを含む、かつ本発明の二本鎖 s i n A 分子の一方または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方への、または本発明の一本鎖 s i n A 分子への結合の点である、式V11を有する化合物を特徴とする。この修飾は、本明細書において“グリセリル”と称される（例えば、図100の修飾6を参照）。

【0079】

別の態様においては、式V, V1またはV11のいずれかを有する本発明の成分は、本発明の s i n A 分子の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在する。例えば、式V, V1またはV11を有する成分は、s i n A 分子のアンチセンス鎖、センス鎖、またはアンチセンス鎖およびセンス鎖の両方の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在することができ、さらに、式V11を有する成分は、本明細書に記載されるように、ヘアピン s i n A 分子の3'末端または5'末端に存在することができる。

【0080】

別の態様においては、本発明の s i n A 分子は、式VまたはV1を有する無塩基残基を含み、ここで、式V1またはV11を有する無塩基残基は、3'-3', 3'-2', 2'-3', または5'-5'コグアイグエーションで、例えば、一方または両方の s i n A 鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方で s i n A コンストラクトに結合している。

【0081】

1つの態様においては、本発明の s i n A 分子は、例えば、s i n A 分子の5'末端、3'末端、5'末端および3'末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせにおいて、1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）のロッグ核酸 (LNA) スケレオチドを含む。

【0082】

別の態様においては、本発明の s i n A 分子は、例えば、s i n A 分子の5'末端、3'末端、5'末端および3'末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせにおいて、1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の非環状ヌクレオチドを含む。

【0083】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i n A がセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 (s i n A) 分子を特徴とし、ここで、センス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ポリミジンスクアレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであり（例えば、すべてのポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、あるいは複数のポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドである）、かつ、センス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ポリンスクアレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、あるいは複数のポリンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドである）。

【0084】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i n A がセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 (s i n A) 分子を特徴とし、ここで、センス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ポリミジンスクアレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであり（例えば、すべてのポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、あるいは複数のポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドである）、かつ、センス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ポリンスクアレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、あるいは複数のポリンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドである）、かつ、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ポリンスクアレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、あるいは複数のポリンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドである）。

【0085】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i n A がアンチセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 (s i n A) 分子を特徴とし、ここで、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ポリミジンスクアレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであり（例えば、すべてのポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、あるいは複数のポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドである）、かつ、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ポリンスクアレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、あるいは複数のポリンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドである）。

【0086】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された s i n A がアンチセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 (s i n A) 分子を特徴とし、ここで、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ポリミジンスクアレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであり（例えば、すべてのポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、あるいは複数のポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドである）、かつ、アンチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）ポリンスクアレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドである）。

ルグリンスケルオチドであり（例えば、すべてのグリンスケルオチドが2' - O - メチルグリンスケルオチドであるか、あるいは複数のグリンスケルオチドが2' - O - メチルグリンスケルオチドである）、ここで、前記アノチセンス領域中に存在する3' 末端ヌクレオチドが2' - O - ハングを含む任意のヌクレオチドは2' - デオキシヌクレオチドである。

【0087】

1つの状態においては、本発明は、化学的に修飾されたs i n Aがアノチセンス領域を含む本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、ここで、アノチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）トリミジンヌクレオチドは2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのトリミジンヌクレオチドが2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のトリミジンヌクレオチドが2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである）、かつ、アノチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）グリンスケルオチドは2' - デオキシグリンスケルオチドである（例えば、すべてのグリンスケルオチドが2' - デオキシグリンスケルオチドであるか、あるいは複数のグリンスケルオチドが2' - デオキシグリンスケルオチドである）。

【0088】

1つの状態においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系においてH I Vに対するRNA干渉（RNA i）を媒介しうる、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、ここで、化学的に修飾されたs i n Aはセンス領域を含む、ここで、センス領域中に存在する1またはそれ以上のトリミジンヌクレオチドは2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのトリミジンヌクレオチドが2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のトリミジンヌクレオチドが2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである）、かつ、アノチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）グリンスケルオチドは2' - デオキシグリンスケルオチドである（例えば、すべてのグリンスケルオチドが2' - デオキシグリンスケルオチドであるか、あるいは複数のグリンスケルオチドが2' - デオキシグリンスケルオチドである）。

【0089】

1つの状態においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系においてH I Vに対するRNA干渉（RNA i）を媒介しうる、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、ここで、化学的に修飾されたs i n Aはセンス領域を含む、ここで、センス領域中に存在する1またはそれ以上のトリミジンヌクレオチドは2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのトリミジンヌクレオチドが2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のトリミジンヌクレオチドが2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである）、かつ、アノチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）グリンスケルオチドは2' - デオキシグリンスケルオチドである（例えば、すべてのグリンスケルオチドが2' - デオキシグリンスケルオチドであるか、あるいは複数のグリンスケルオチドが2' - デオキシグリンスケルオチドである）。

【0090】

1つの状態においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系にお

いてH I Vに対するRNA干渉（RNA i）を媒介しうる本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、ここで、s i n Aはセンス領域を含み、ここで、センス領域中に存在する1またはそれ以上のトリミジンヌクレオチドは2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのトリミジンヌクレオチドが2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のトリミジンヌクレオチドが2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである）、かつ、アノチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）グリンスケルオチドは2' - デオキシグリンスケルオチドである（例えば、すべてのグリンスケルオチドが2' - デオキシグリンスケルオチドであるか、あるいは複数のグリンスケルオチドが2' - デオキシグリンスケルオチドである）。

【0091】

1つの状態においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系においてH I Vに対するRNA干渉（RNA i）を媒介しうる本発明の化学的に修飾された短干渉核酸（s i n A）分子を特徴とし、ここで、化学的に修飾されたs i n Aはセンス領域を含む、ここで、センス領域中に存在する1またはそれ以上のトリミジンヌクレオチドは2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのトリミジンヌクレオチドが2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のトリミジンヌクレオチドが2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである）、かつ、アノチセンス領域中に存在する任意の（例えば、1またはそれ以上、またはすべての）グリンスケルオチドは2' - デオキシグリンスケルオチドである（例えば、すべてのグリンスケルオチドが2' - デオキシグリンスケルオチドであるか、あるいは複数のグリンスケルオチドが2' - デオキシグリンスケルオチドである）。

2'-デオキシ-2'-フルオロビリミジンヌクレオチドであり(例えば、すべてのビリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロビリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のビリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロビリミジンヌクレオチドである)、アミンセリヌ領域中に存在する1またはそれ以上のアミノヌクレオチドは、2'-デオキシヌクレオチド、ロウチ核糖(LNA)ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-メトキシエチルヌクレオチド、および2'-デオキシヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、ロウチ核糖(LNA)ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-メトキシエチルヌクレオチド、および2'-デオキシヌクレオチドからなる群より選択される(例えば、すべてのアミノヌクレオチドが2'-メトキシエチルヌクレオチド、ロウチ核糖(LNA)ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-メトキシエチルヌクレオチド、および2'-デオキシヌクレオチドからなる群より選択されるか、あるいは複数のアミノヌクレオチドが2'-メトキシエチルヌクレオチド、ロウチ核糖(LNA)ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-メトキシエチルヌクレオチド、および2'-デオキシヌクレオチドからなる群より選択されるか、またはそれ以上(例えば1, 2, 3, または4個)のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。

[0091]

別の態様においては、本発明のs i n A分子中に存在する任意の修飾ヌクレオチドは、好ましくは、本発明のs i n A分子のアミンセリヌ鎖に存在するが、また任意に、セリヌおよび/またはアミンセリヌ鎖の両方に存在してもよく、これは、天然に生ずるリボヌクレオチドと類似する特性または特徴を有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば、ノザンコンフメーション(例えば、ノザン偽回転サイクル、例えば、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984を参照)を有する修飾ヌクレオチドを含むs i n A分子を特徴とする。このように、本発明のs i n A分子中に存在する化学的に修飾されたヌクレオチドは、好ましくは、本発明のs i n A分子のアミンセリヌ鎖に存在するが、また任意にセリヌおよび/またはアミンセリヌ鎖およびセリヌ鎖の両方に存在してもよく、これはヌクレオチドの両方に存在すると同時にRNA1を媒介する能力を維持する。ノザンコンフメーションを有するヌクレオチドの非限定的例としては、ロウチ核糖(LNA)ヌクレオチド(例えば、2'-O, 4'-C-メチレン-(D-リボフラノシル)ヌクレオチド); 2'-メトキシエトキシ(MOE)ヌクレオチド; 2'-メチル-チオ-エチル, 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド, 2'-デオキシ-2'-クロロヌクレオチド, 2'-アジドヌクレオチド, および2'-O-メチルヌクレオチドが挙げられる。

[0092]

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系においてHIVに対するRNA干渉(RNAi)を媒介する化学的に修飾された短干渉核糖酸分子(s i n A)を特徴とし、ここで、化学的修飾は、化学的に修飾されたs i n A分子に共有結合したコンジュゲートを含む。別の態様においては、コンジュゲートは化学的に修飾されたs i n A分子に生物分解性リンカーを介して共有結合している。1つの態様においては、コンジュゲート分子は、化学的に修飾されたs i n A分子のセリヌ鎖、アミンセリヌ鎖、または両方の鎖の3'末端に結合している。別の態様においては、コンジュゲート分子は、化学的に修飾されたs i n A分子のセリヌ鎖、アミンセリヌ鎖、または両方の鎖の3'末端および5'末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせに結合している。1つの態様においては、本発明のコンジュゲート分子は、化学的に修飾されたs i n A分子の生物学的

システム(例えば細胞)へのデリバリーを促進する分子を含む。別の態様においては、化学的に修飾されたs i n A分子に結合したコンジュゲート分子は、ポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン、または細胞取り込みを媒介することができる細胞シセプターのリガンドである。化学的に修飾されたs i n A分子に結合させることができる、本発明により企図される特定のコンジュゲート分子の例は、Vartsgian (米国特許出願10/201,394, 本明細書の一部としてここに引用する)に記載される。用いられるコンジュゲートのタイプおよび本発明のs i n A分子のコンジュゲーションの程度は、同時にs i n AがRNA1活性を媒介する能力を維持しながら、s i n Aが安定性について評価されることができる。このように、当業者は、例えば、当該技術分野において一般的に知られる動物モデルにおいて、種々のコンジュゲートで修飾されたs i n Aコンストラクトをスクリーニングして、s i n Aコンジュゲート複合体がRNA1を媒介する能力を維持しながら改良された特性を有するかを判定することができる。

[0093]

1つの態様においては、本発明は、s i n Aがさらにs i n Aのセリヌ領域とs i n Aのアミンセリヌ領域とを連結させるヌクレオチド、非ヌクレオチド、または組合ヌクレオチド/非ヌクレオチドリソナーを含む本発明の短干渉核糖酸(s i n A)分子を特徴とする。1つの態様においては、本発明のヌクレオチドリソナーは、2ヌクレオチド以上の長さ、例えば、3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, または10ヌクレオチドの長さのリソナーでありうる。別の態様においては、ヌクレオチドリソナーは、核糖アタマーであってよい。本明細書において用いる場合、"アタマー"または"核糖アタマー"とは、標的分子に特異的に結合する核糖分子を意味し、ここで、核糖分子は、その天然の安定性において標的分子により認識される配列を含む配列を有する。あるいは、アタマーは天然には核糖に結合しない標的分子に結合する核糖分子であってもよい。標的分子は目的とする任意の分子でありうる。例えば、アタマーを用いて蛋白質のリガンド結合ドメインに結合させ、このことにより、天然に生ずるリガンドと蛋白質との相互作用を妨げる手がかりである。これは非限定的例であり、当業者は当該技術分野において一般に知られる手法を用いて他の態様を容易に生成しうることを認識するであろう(例えば、Gold et al., 1995, Annu. Rev. Biochem., 64, 763; Brody and Gold, 2000, J. Biotechnol., 74, 5; Sun, 2000, Curr. Opin. Mol. Ther., 2, 100; Kussner, 2000, J. Biotechnol., 74, 27; Hermann and Patel, 2000, Science, 287, 820; およびJayasena, 1999, Clinical Chemistry, 45, 1628を参照)。

[0094]

さらに別の態様においては、本発明の非ヌクレオチドリソナーには、無糖基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭水化物、または他のポリマー性化合物(例えば、ポリエチレングリコール、例えば2-100個のエチレングリコール単位を有するもの)が含まれる。特定の例としては、Seela and Kaiser, Nucleic Acids Res. 1990, 75:635 and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113:173:63 and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113:173:63; Res. 1993, 27:2585およびBiochemistry 1993, 32:1751; Durand et al., Nucleic Acids Res. 1990, 75:6353; McCurdy et al., Nucleosides & Nucleotides 1991, 10:287; Jischke et al., Tetrahedron Lett. 1993, 34:301; Ono et al., Biochemistry 1991, 30:9914; Arnold et al., 国際公開W





注する1またはそれ以上のポリミジンスクアレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであり(例えば、すべてのポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、あるいは複数のポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドである)。また、ポリミジンスクアレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであり、あるいは、すべてのポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、あるいは、複数のポリミジンスクアレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロポリミジンスクアレオチドであるか、および末端キヤップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示される任意の修飾を含み、これは任意にアッセン配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在しているもよく、sINAはさらに任意に、sINA分子の3'末端に約1-約4個(例えば、約1、2、3、または4個)の末端2'-デオキシスクアレオチドを含んでいてもよく、ここで末端スクアレオチドはさらに1またはそれ以上(例えば、1、2、3、または4個)のホスホロチオエートスクアレオチド間結合を含むことができ、sINAはさらに任意に、末端リン酸基、例えば5'末端リン酸基を含むことができる。

【01011】別の態様においては、本発明の一本鎖sINA分子中に存在する任意の修飾スクアレオチドは、天然に生ずるリボススクアレオチドと類似する特性または特徴を有する修飾スクアレオチドを含む。例えば、本発明は、ノザンコンゾメーション(例えば、ノザン転回転(pseudorotation))サイクル(例えば、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984を参照)を有する修飾スクアレオチドを含むsINA分子を特徴とする。このように、本発明の一本鎖sINA分子中に存在する化学的に修飾されたスクアレオチドは、好ましくは、ヌクレアーゼ分解に耐性であり、同時にRNAiを媒介する能力を維持する。

【0102】一つの態様においては、本発明は、細胞中においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINA鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)細胞中におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsINA分子を細胞に導入することを含む。

【0103】一つの態様においては、本発明は、細胞中においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINA鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、sINAのセンス鎖配列は標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして(b)細胞中におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsINA分子を細胞に導入することを含む。

【0104】別の態様においては、本発明は、細胞中において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINA鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)細胞中におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsINA分子を細胞に導入することを含む。

【0105】別の態様においては、本発明は、細胞中において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINA鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、sINAのセンス鎖配列は、標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして(b)細胞中におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsINA分子を細胞に導入することを含む。

【0106】一つの態様においては、本発明のsINA分子は、エクソビオ用途において試薬として用いられる。例えば、治療効果のために被験者の中に移植される組織または細胞にsINA試薬を導入する。細胞および/または組織は、その後、外植片を受け取る生物または被験者由来であってもよく、移植前の別の生物または被験者由来であってもよい。sINA分子を用いて、インビトロで移植された場合に細胞または組織が所望の表現型を獲得し、または機能を実行しようように、細胞または組織における1またはそれ以上の遺伝子の発現を調節することができる。一つの態様においては、ある種の標的細胞が患者から抽出される。これらの抽出細胞は、これらの細胞によるsINAの取込みに適した条件下で(例えば、カチオン性脂質、リポソーム等などのデリバリー試薬を用いて、またはエレクトロポレーションなどの方法を用いて、細胞へのsINAのデリバリーを促進することにより)、細胞内の特定のヌクレオチド配列を標的とするsINAと接触させる。次に、細胞を同じ患者または他の患者に再導入する。

【0107】一つの態様においては、本発明は、外植組織においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINA鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)外植組織中でHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、sINA分子を特定の生物に由来する外植組織の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物においてHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、外植組織をその組織が由来する生物に戻すか、または別の生物に導入することを含む。

【0108】一つの態様においては、本発明は、組織外植片においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINA鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み、sINAのセンス鎖配列は標的RNAの配列と同一の配列を含み；そして(b)組織外植片におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、sINA分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0109】別の態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINA鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)組織外植片におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、sINA分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0110】一つの態様においては、本発明は、生物においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINA鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsINA分子を生物に導入することを含む。

【0111】別の態様においては、本発明は、生物において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINA鎖の一方はHIV遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)生物



b) 生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsINA分子を生物に導入することを含む。

【0112】  
一つの態様においては、本発明は、細胞内においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 細胞におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsINA分子を細胞に導入することを含む。

【0113】  
別の態様においては、本発明は、細胞内において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 細胞におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、sINA分子をインビトロまたはインビボで細胞と接触させる、ことを含む。

【0114】  
一つの態様においては、本発明は、組織外植片においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 組織外植片におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、sINA分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞と接触させる、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0115】  
別の態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 組織外植片におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、sINA分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【0116】  
一つの態様においては、本発明は、生物においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsINA分子を生物に導入することを含む。

【0117】  
別の態様においては、本発明は、生物において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のsINA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、sINAはHIV遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b) 生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsINA分子を生物に導入することを含む。

【0118】  
一つの態様においては、本発明は、生物においてHIV遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、生物を本発明のsINA分子と接触させることを含む。

【0119】  
別の態様においては、本発明は、生物において2以上のHIV遺伝子の発現を調節する

方法の特徴とし、該方法は、生物におけるHIV遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、生物を1またはそれ以上の本発明のsINA分子と接触させることを含む。

【0120】  
本発明のsINA分子は、種々のRNA分子を標的とするRNAiにより標的(HIV)遺伝子の発現が阻害されるよう設計することができる。一つの態様においては、本発明のsINA分子は、標的遺伝子に対応する種々のRNAを標的とするよう利用される。そのようなRNAの非限定的例には、mRNA、mRNA、mRNA、標的遺伝子の選択的RNAスプライシング変種、標的遺伝子の転写後修飾RNA、標的遺伝子のスプライシング、および/またはRNAテラプレットが含まれる。選択的スプライシングには、本発明は、適当なエクソンの使用により区別される転写産物のファミリーが生ずる場合には、本発明は、適当なエクソンにより遺伝子発現を阻害して、遺伝子ファミリーメンバーの機能を特異的に阻害するかまたはその間を区別するために用いることができる。例えば、選択的スプライシングされた質膜ドメインを含む質膜ドメインを含有エクソンを標的とすることにより、分泌型の蛋白質に対して、膜結合型のタンパク質の機能的な重要性を判定することができる。本発明を用いて質膜ドメインを含むエクソンを標的とすることにより、分泌型の蛋白質に対して、膜結合型のタンパク質の機能的な重要性を判定することができる。これらのRNA分子を用いることに関連する本発明の出発の非限定的例には、治療的医薬用途、医薬の発見用途、分子診断および遺伝子機能用途、および遺伝子マッピング、例えば本発明のsINA分子を用いる単一ヌクレオチド多型のマッピングが含まれる。そのような用途は、既知の遺伝子配列を用いて、または発現配列タグ(EST)から入手可能な部分配列から実行することができる。

【0121】  
別の態様においては、本発明のsINA分子は、遺伝子ファミリー、例えばHIVファミリー遺伝子に対応する保存配列を標的とするために用いられる。そのように、多くのHIV標的を標的とするsINA分子は、増加した治療効果を提供することができる。さらに、sINAは、種々の応用において遺伝子機能の経路を特性決定するために用いることができ。例えば、本発明を用いて、経路における標的遺伝子の活性を阻害して、遺伝子機能分析、mRNA機能分析、または細胞分析において、特性決定されていない遺伝子の機能を決定することができる。本発明は、医薬開発に向けて、種々の疾病および健康状態に関連する可能性のある標的遺伝子経路を決定するために用いることができる。本発明は、例えば、癌の進行および/または維持に関与する遺伝子発現の経路を理解するために用いることができる。

【0122】  
一つの態様においては、本発明のsINA分子および/または方法は、Genbank受託番号で表されるRNAをコードする遺伝子、例えば、本明細書においてGenbank受託番号(例えば本明細書に開示されるGenbank受託番号)で表されるRNA配列をコードするHIV遺伝子の発現を阻害するために用いられる。

【0123】  
一つの態様においては、本発明は、(a) 予め決定された複雑性を有するsINACONストラクトのライブラリを生成し、そして(b) 標的RNA配列中のRNAi標的部位を決定するのに適した条件下で、上述の(a)のsINACONストラクトをアッセイすることを含む方法を特徴とする。別の態様においては、(a)のsINA分子は、固定された長さ、例えば、約23ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに別の態様においては、(a)のsINA分子は、異なる長さのものであり、例えば、約19〜約25(例えば、約19、20、21、22、23、24、または25)ヌクレオチドの長さの鎖を有する。一つの態様においては、アッセイは、本明細書に記載されるような再構成されたインビトロsINAAアッセイを含むことができる。別の態様においては、アッセイは、標的RNAが発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては、RNAase保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して、標的RNA配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的RNA配列は、当該技術分野において知られるように、例えば、

クローニンガおよび/またはインビトロ系については転写、インビトロ系においては細胞発現により、得ることができる。

【0124】  
1つの態様においては、本発明は、(a) 予め決定された複製性、例えば4<sup>F</sup>(Nは、s i n a c o n s t r a k t の鎖のそれぞれにおいて塩基対形成したヌクレオチドの数を示し、例えば、19塩基対を有する21ヌクレオチドのセンス鎖およびアンチセンス鎖を有するs i n a c o n s t r a k t については、複製性は4<sup>19</sup>となる)を有するランダム化されたs i n a c o n s t r a k t のライブラリを生成し；そして(b) 標的H I V RNA配列中のRNA i 標的領域を決定するのに適した条件下で、上述の(a)のs i n a c o n s t r a k t をアッセイする、各工程を含む方法の特徴とする。別の態様においては、(a)のs i n a c o n s t r a k t は、固定された長さ、例えば約23ヌクレオチドの長さの鎖を含む。約19-約25(例えば、約19、20、21、22、23、24、または25)ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、アッセイは、本明細書の実施例7に記載されるような、再構成されたインビトロs i n a c o n s t r a k t を含むことができる。別の態様においては、アッセイは、標的RNAが発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては、H I V RNAのフラグメントを、例えば、ゲル電気泳動、ノザンロット分析、またはRNAse保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して、標的H I V RNA配列中の最も適当な標的領域を決定する。標的H I V RNA配列は、当該技術分野において知られるように、例えば、クローニンガおよび/またはインビトロ系については転写により、インビトロ系においては細胞発現により、得ることができる。

【0125】  
別の態様においては、本発明は、(a) 標的遺伝子によりコードされるRNA i 標的の配列を分析し；(b) (a)のRNA i またはそれ以上の領域に相補的な配列を有する1またはそれ以上のs i n a c o n s t r a k t の鎖を合成し；そして(c) 標的RNA配列中のRNA i 標的を決定するのに適した条件下で(b)のs i n a c o n s t r a k t をアッセイする、各工程を含む方法の特徴とする。1つの態様においては、(b)のs i n a c o n s t r a k t は、固定された長さ、例えば約23ヌクレオチドの長さの鎖を有する。別の態様においては、(b)のs i n a c o n s t r a k t は、異なる長さ、例えば、約19-約25(例えば、約19、20、21、22、23、24、または25)ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては、アッセイは、本明細書に記載されるような再構成されたインビトロs i n a c o n s t r a k t を含むことができる。別の態様においては、アッセイは、標的RNAが発現されている細胞培養系を含むことができる。標的RNAのフラグメントを、例えば、ゲル電気泳動、ノザンロット分析、またはRNAse保護アッセイにより分析して、標的RNA配列中の最も適当な標的領域を決定する。標的RNA配列は、当該技術分野において知られるようにして、例えば、クローニンガおよび/またはインビトロ系については転写により、インビトロ系においては細胞発現により、得ることができる。

【0126】  
“標的領域”とは、アンチセンス領域中に標的配列に相補的な配列を含むs i n a c o n s t r a k t により媒介される切断の“標的”とされる。標的RNA中の配列を意味する。

【0127】  
“検出可能なレベルの切断”とは、標的RNAのランダム分解から生成するRNAのバックグラウンドから切断産物を識別するのに十分な程度の標的RNAの切断(および切断産物RNAの形成)を意味する。ほとんどの検出方法について、標的RNAの1-5%から切断産物が生成すれば、バックグラウンドから検出するのに充分である。

【0128】  
1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明のs i n a c o n s t r a k t を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む組成物を特徴とする。別の態様においては、本発明は、1またはそれ以上の遺伝子を標的とし、化学的に修飾されていてもよい

本発明のs i n a c o n s t r a k t 分子を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む医薬組成物を特徴とする。別の態様においては、本発明は、被験者において疾病または健康状態の治療または予防する方法を特徴とし、該方法は、被験者における疾病または健康状態の治療または予防に適した条件下で、被験者に本発明の組成物を単独または1またはそれ以上の他の治療用化合物と併用して投与することを含む。さらに別の態様においては、本発明は、被験者において組織拒絶を低減または予防する方法を特徴とし、該方法は、被験者における組織拒絶の低減または予防に適した条件下で被験者に本発明の組成物を投与することを含む。

【0129】  
別の態様においては、本発明は、H I V 遺伝子標的を評価する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs i n a c o n s t r a k t 分子を合成し、これは化学的に修飾されてもよく、s i n a c o n s t r a k t の一方はH I V 標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；(b) 細胞、組織、または生物においてH I V 標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i n a c o n s t r a k t 分子を細胞、組織、または生物に導入し；そして(c) 細胞、組織、または生物における表現型変化をアッセイすることにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

【0130】  
別の態様においては、本発明は、H I V 標的を評価する方法を特徴とし、該方法は、(a) 本発明のs i n a c o n s t r a k t 分子を合成し、これは化学的に修飾されていてもよく、s i n a c o n s t r a k t の一方はH I V 標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；(b) 生物学的システムにおけるH I V 標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i n a c o n s t r a k t 分子を生物学的システムに導入し；そして(c) 生物学的システムにおける表現型の変化をアッセイすることにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

【0131】  
“生物学的システム”とは、生物起源、例えば、限定されないが、ヒト、動物、植物、昆虫、細菌、ウイルスまたは他の起源からの、複製されたまたは複製されていない形の物質を意味し、ここで、システムはRNA i 活性に必要な成分を含む。“生物学的システム”との用語には、例えば、細胞、組織、または生物、またはそれらの抽出物が含まれる。生物学的システムとの用語にはまた、インビトロの設定で用いることができる再構成されたRNA i 系が含まれる。

【0132】  
“表現型変化”とは、本発明の核酸分子(例えばs i n a c o n s t r a k t)との接触または処理にตอบสนองする任意の検出可能な細胞の変化を意味する。そのような検出可能な変化には、限定されないが、形状、サイズ、増殖、運動性、蛋白質発現またはRNA発現、または当該技術分野において知られる方法によりアッセイすることができる他の物理学的または化学的変化が含まれる。検出可能な変化にはまた、グリーン蛍光蛋白質(GFP)等のレポーター遺伝子/分子、または発現された蛋白質を同定するために用いられる種々のタグ、またはアッセイすることができる任意の他の細胞成分の発現が含まれる。

【0133】  
1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明のs i n a c o n s t r a k t 分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物におけるH I V 標的遺伝子の発現を調節するために用いることができる。別の態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい2以上の本発明のs i n a c o n s t r a k t 分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物において2以上のH I V 標的遺伝子の発現を調節するために用いることができる。

【0134】  
1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明の1またはそれ以上のs i n a c o n s t r a k t 分子を含有する細胞を特徴とする。別の態様においては、本発明のs i n a c o n s t r a k t 分子を含有する細胞は哺乳動物細胞である。さらに別の態様においては、本発明のs i n a c o n s t r a k t 分子を含有する細胞はヒト細胞である。

【0135】

1つの態様においては、化学的に修飾されていてもよい本発明の s i n A 分子の合成は、(a) s i n A 分子の2つの相補的鎖を合成し；(b) 二本鎖 s i n A 分子を得るのに適した条件下で2つの相補的鎖を一緒にアニーリングさせる、ことを含む。別の態様においては、s i n A 分子の2つの相補的鎖の合成は、固相オリゴヌクレオチド合成により行う。さらに別の態様においては、s i n A 分子の2つの相補的鎖の合成は、固相タンデムオリゴヌクレオチド合成により行う。

【0136】  
1つの態様においては、本発明は、s i n A デュープレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、(a) s i n A 分子の第1のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、第1のオリゴヌクレオチド配列鎖は s i n A の第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の合成の足場として用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；(b) 第1のオリゴヌクレオチド配列鎖の足場上で s i n A の第2のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、第2のオリゴヌクレオチド配列鎖はさらに、s i n A デュープレックスを精製するために用いることができる化学成分を含み；(c) 2つの s i n A デュープレックス分子をリンカー分子を切断し；そして(d) 第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学成分を利用して s i n A デュープレックスを精製する、の各工程を含む。1つの態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の間に、例えば、メチルアミン等のアルキルアミン塩基を用いて加水分解条件下で行う。1つの態様においては、合成の方法は、調整多孔ガラス(CPG)またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含み、ここで、(a)の第1の配列は、固体支持体を足場として用いるスケニルリンカー等の切断可能なリンカー上で合成される。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーと(a)の切断可能なリンカーの切断が同時に行われるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性を有することができる。別の態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列の単離に用いることができる(b)の化学成分は、ジメトキシトリチル基等のトリチル基を含み、これは本明細書に記載されるトリチルオン合成戦略において利用することができる。さらに別の態様においては、ジメトキシトリチル基等の化学成分は、精製の間に、例えば脱性条件を用いて除去する。

【0137】  
さらに別の態様においては、s i n A 合成の方法は溶液相合成またはハイブリッド相合成であり、ここでは、第1の配列に結合され、第2の配列の合成の足場として作用する切断可能なリンカーを用いて、s i n A デュープレックスの両方の鎖をタンデムで合成する。別々の s i n A 配列鎖がハイブリダイズするのに適した条件下でリンカーを切断することにより、二本鎖 s i n A 分子が形成される。

【0138】  
別の態様においては、本発明は、s i n A デュープレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、(a) s i n A 分子の一方のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、配列は他方のオリゴヌクレオチド配列の合成の足場として用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；(b) 第1の配列鎖に対して相補性を有する第2のオリゴヌクレオチド配列を(a)の足場上で合成し、ここで、第2の配列は二本鎖 s i n A の他方の鎖を含み、かつ、第2の配列はさらに、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる化学成分を含み；(c) 第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学成分を利用して、切断可能なリンカーにより接続された両方の s i n A オリゴヌクレオチド鎖を含む全長配列を単離するのに適した条件下で、かつ、2つの s i n A オリゴヌクレオチド鎖がハイブリダイズして安定なデュープレックスを形成するのに適した条件下で、(b)の生成物を精製する、の各工程を含む。1つの態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の間に、例えば加水分解条件下で行う。別の態様においては、上述の(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護の後に行う。別の態様においては、合成の方法は、調整多孔ガラス(CPG)またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含む、ここで、(a)の第1の配列は、スケニルリンカー等の切断可能なリンカー上で、固体支持体を足場として用いて合成する。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーと(a)の切断可能なリンカーの切断が同時に行われるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性を有することができる。別の態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列の単離に用いることができる(b)の化学成分は、ジメトキシトリチル基等のトリチル基を含み、これは本明細書に記載されるトリチルオン合成戦略において利用することができる。さらに別の態様においては、ジメトキシトリチル基等の化学成分は、精製の間に、例えば脱性条件を用いて除去する。

CPG) またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含む、ここで、(a)の第1の配列は、スケニルリンカー等の切断可能なリンカー上で、固体支持体を足場として用いて合成する。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーおよび(a)の切断可能なリンカーが同時にまたは別々に切断されるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性または異なる反応性を有することができる。1つの態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる(b)の化学成分は、トリチル基、例えばジメトキシトリチル基を含む。

【0139】  
別の態様においては、本発明は、1回の合成プロセスで二本鎖 s i n A 分子を作製する方法を特徴とし、該方法は、(a) 第1の配列および第2の配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、ここで、第1の配列は第2の配列に相補的であり、第1のオリゴヌクレオチド配列は切断可能なリンカーを介して第2の配列に連結されており、かつ、第2の配列を有するオリゴヌクレオチドには末端5'-保護基、例えば、5'-O-ジメトキシトリチル基(5'-O-DMT)が現存しており；(b) オリゴヌクレオチドを脱保護し、このことにより脱保護によって2つのオリゴヌクレオチド配列を結合しているリンカーが切断され；そして(c) 二本鎖 s i n A 分子を単離するのに適した条件下で、例えば本明細書に記載されるトリチルオン合成戦略を用いて、(b)の生成物を精製する、の工程を含む。

【0140】  
別の態様においては、本発明の s i n A 分子の合成の方法は、Scarierらの米国特許5,889,136；6,008,400；および6,111,086(その全体を本明細書の一部としてここに引用する)の教示を含む。

【0141】  
1つの態様においては、本発明はHIVに対するRNAiを媒介する s i n A コンストラクトを特徴とし、s i n A コンストラクトは、s i n A コンストラクトのヌクレオチド配列を増加させる1またはそれ以上の化学的修飾、例えば、式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0142】  
別の態様においては、本発明は、ヌクレオチド配列が増加している s i n A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i n A 分子に導入し、そして(b)ヌクレオチド配列が増加している s i n A 分子を単離するのに適した条件下で工程(a)の s i n A 分子をアッセイする、ことを含む。

【0143】  
1つの態様においては、本発明はHIVに対するRNAiを媒介する s i n A コンストラクトを特徴とし、s i n A コンストラクトは、s i n A コンストラクトのセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性を調節する、1またはそれ以上の本明細書に記載される化学的修飾を含む。

【0144】  
別の態様においては、本発明は、s i n A 分子のセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性を増加している s i n A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i n A 分子に導入し、そして(b) s i n A 分子のセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性が増加している s i n A 分子を単離するのに適した条件下で工程(a)の s i n A 分子をアッセイする、ことを含む。

【0145】  
1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNAiを媒介する s i n A コンストラクトを特徴とし、s i n A コンストラクトは、s i n A コンストラクトのアンチセンス鎖と細胞中の相補的RNA配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載される

る1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

[0146]

1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNAiを媒介するs i n a c o n s t r a c t を特徴とし、s i n a c o n s t r a c t は、s i n a c o n s t r a c t のアプテセンズ鎖と細胞中の相補的標的DNA配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

[0147]

別の態様においては、本発明は、s i n a 分子のアプテセンズ鎖と相補的標的RNA配列との間の結合親和性が増加しているs i n a 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a 分子に導入し、そして(b) s i n a 分子のアプテセンズ鎖と相補的標的RNA配列との間の結合親和性が増加しているs i n a 分子を同定するのに適した条件下で工程(a)のs i n a 分子をアッセイする、ことを含む。

[0148]

別の態様においては、本発明は、s i n a 分子のアプテセンズ鎖と相補的標的DNA配列との間の結合親和性が増加しているs i n a 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a 分子に導入し、そして(b) s i n a 分子のアプテセンズ鎖と相補的標的DNA配列との間の結合親和性が増加しているs i n a 分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a 分子をアッセイする、ことを含む。

[0149]

1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNAiを媒介するs i n a c o n s t r a c t を特徴とし、s i n a c o n s t r a c t は、化学的に修飾されたs i n a c o n s t r a c t に対する配列ホモロジーを有する追加の内因性s i n a 分子を生成しうる細胞性ポリヌクレオチドのポリヌクレオチドのポリヌクレオチド活性を調節する、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

[0150]

別の態様においては、本発明は、化学的に修飾されたs i n a 分子に対して配列ホモロジーを有する追加の内因性s i n a 分子を生成しうる細胞性ポリヌクレオチドのポリヌクレオチドのポリヌクレオチド活性を調節する、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

[0151]

1つの態様においては、本発明は、細胞においてHIVに対するRNAiを媒介する化学的に修飾されたs i n a c o n s t r a c t を特徴とし、ここで、化学的修飾は、そのようなs i n a c o n s t r a c t により媒介されるRNAiの効率を低下させるような様式で、s i n a と標的RNA分子、DNA分子および/または蛋白質またはRNAiに必須の他の因子との相互作用に有意に影響を与えない。

[0152]

別の態様においては、本発明は、HIVに対する改良されたRNAi活性を有するs i n a 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a 分子に導入し、そして(b)改良されたRNAi活性を有するs i n a 分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a 分子をアッセイする、ことを含む。

[0153]

さらに別の態様においては、本発明は、HIV標的RNAに対する改良されたRNAi活性を有するs i n a 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIの

いずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a 分子に導入し、そして(b)標的RNAに対する改良されたRNAi活性を有するs i n a 分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a 分子をアッセイする、ことを含む。

[0154]

さらに別の態様においては、本発明は、HIV標的DNAに対する改良されたRNAi活性を有するs i n a 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a 分子に導入し、そして(b)標的DNAに対する改良されたRNAi活性を有するs i n a 分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a 分子をアッセイする、ことを含む。

[0155]

1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNAiを媒介するs i n a c o n s t r a c t を特徴とし、ここで、s i n a c o n s t r a c t は、s i n a c o n s t r a c t の細胞取り込みを調節する本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

[0156]

別の態様においては、本発明は、改良された細胞取り込みを有する、HIVに対するs i n a 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a 分子に導入し、そして(b)改良された細胞取り込みを有するs i n a 分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a 分子をアッセイする、ことを含む。

[0157]

1つの態様においては、本発明は、HIVに対するRNAiを媒介するs i n a c o n s t r a c t を特徴とし、ここで、s i n a c o n s t r a c t は、例えば、s i n a c o n s t r a c t の薬物動態を改良するポリエチレングリコールまたは同等のコンジュゲート等のポリマー性コンジュゲートを結合させることにより、またはインドピロ特定の組織のタイアまたは細胞のタイアにターゲティングするコンジュゲートを結合させることにより、s i n a c o n s t r a c t の生物利用性を増加させる、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。そのようなコンジュゲートの非限定的例は、V a r g e e s e t a l . , 米国特許出願10/201,394 (本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。

[0158]

1つの態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のs i n a 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)コンジュゲートをs i n a 分子の構造中に導入し、そして(b)改良された生物利用性を有するs i n a 分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a 分子をアッセイする、ことを含む。そのようなコンジュゲートには、細胞シグナルのリガンド、例えば、天然に生ずる蛋白質リガンドに由来するペプチド；蛋白質局在化配列、例えば細胞Z L P コード配列；抗体；核酸アタック；ビタミンおよび他の補因子、例えば葉酸およびN-アセチルガラクトースアミン；ポリマー、例えばポリエチレングリコール(P E G)；リン脂質；ポリアミン、例えばスベルミンまたはスベルミジン；および他のものが含まれる。

[0159]

別の態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のs i n a 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)膜形成方をs i n a 分子に導入し、そして(b)改良された生物利用性を有するs i n a 分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)のs i n a 分子をアッセイする、ことを含む。そのような膜形成には、ポリマー、例えばシクロデキストリン、脂質、カチオン性脂質、ポリアミン、リン脂質、およびその他のものが含まれる。

[0160]

別の態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明のs i n a 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドをs i n a 分子に導入し、そして(b)改良された

生物利用性を有する s i n A 分子を単離するのに適した条件下で工程 (a) の s i n A 分子をアッセイすることを含む。

[0161]

別の態様においては、本発明の s i n A 化合物にポリエチレングリコール (PEG) を共有結合的に結合させることができる。結合した PEG は、任意の分子量のものであってよく、好ましくは約 2,000-約 50,000 ダルトン (Da) である。

[0162]

本発明は、単独で、またはインビトロまたはインビボで RNA を試験サンプルおよび/または被験者に導入するのに必要な試験の少なくとも一つを有するキットの成分として、用いることができる。例えば、キットの好ましい成分には、本発明の s i n A 分子、および本明細書に記載されるような、目的とする細胞内への s i n A の導入を促進するペプチルが含まれる (例えば、脂質および当該技術分野において知られる他のトランスフェクション法を用いる。例えば、Belgelman et al., 米国特許 6,395,713 を参照)。キットは、遺伝子機能および/または活性の決定において標的評価のために、または薬剤最適化において、および薬剤の開発において用いることができる (例えば、Usman et al., 米国特許出願 60/402,996 を参照)。そのようなキットはまた、キットのユーザが本発明を実施できるようにするための指針を含んでいてもよい。

[0163]

本明細書において用いる場合、“短干渉核酸”、“s i n A”、“短干渉 RNA”、“s i r N A”、“短干渉核酸分子”、“短干渉オリゴヌクレオチド分子”、または“化学的に修飾された短干渉核酸分子”との用語は、配列特異的模式で RNA 干渉 (“RNAi”) または遺伝子サイレンシングを媒介することにより遺伝子発現またはウイルス複製をダウンレギュレートする任意の核酸分子を表す (例えば、Bass, 2001, Nature 411, 428-429; Elbashir et al., 2001, Nature 411, 494-498; および Kreutzer et al., 国際公開 WO00/44895; Zernicka-Goetz et al., 国際公開 WO01/3646; Fire, 国際公開 WO99/32619; Plaut et al., 国際公開 WO00/01846; Meilio and Fire, 国際公開 WO01/29058; Deschamps-DePallette, 国際公開 WO99/07409; および Li et al., 国際公開 WO00/44914; Alishire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; および Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237; Hutvagner and Zamore, 2002, Science, 297, 2056-60; McManus et al., 2002, RNA, 8, 842-850; Reinhart et al., 2002, Gene & Dev., 16, 1616-1626; および Reinhart & Bartel, 2002, Science, 297, 1831 を参照)。本発明の s i n A 分子の非限定的例は、図 4-6 および本明細書の表 11, 111 および IV に示される。例えば、s i n A は、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子であってもよく、ここで、アンチセンス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。s i n A は 2 つの別々のオリゴヌクレオチドから組み立てることができる。ここで一方の鎖はセンス鎖であり、他方はアンチセンス鎖であり、アンチセンス鎖およびセンス鎖は自己相補的であり (すなわち、各鎖は、他方の鎖中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、例えば、アンチセンス鎖とセンス鎖とがデュプレックスまたは二本鎖構造を形成し、例えば、二本鎖領域は約 19 塩基対である)；アンチセンス鎖は標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス鎖は標的核酸配列またはその一

部に対応するヌクレオチド配列を含む。あるいは、s i n A は単一のオリゴヌクレオチドから組み立ててもよく、ここで、s i n A の自己相補的センス領域およびアンチセンス領域は、核酸系または非核酸系のリンカーにより連結されている。s i n A は、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有するヘアピン二次構造を有するポリヌクレオチドであってもよく、ここで、アンチセンス領域は別の標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。s i n A は 2 またはそれ以上のルーブリ構造および自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を含むヌクレオチド配列またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有し、環状ポリヌクレオチドは、インビボまたはインビトロでアロセンシングされて、RNAi を媒介しうる活性な s i n A 分子を生ずることができる。s i n A はまた、標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドまたはその一部のヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドを有する一部に相対するヌクレオチド配列の存在を必要としない場合)、ここで、一本鎖ポリヌクレオチドはさらに末端リン酸基、例えば 5'-リン酸 (例えば、Martinez et al., 2002, Molecular Cell, 10, 537-568 を参照)、または 5', 3', 2'-リン酸を含んでいてもよい。ある態様においては、本発明の s i n A 分子は、別々のセンスおよびアンチセンス配列または領域を含んでいてもよく、センスおよびアンチセンス領域は、当該技術分野において知られるヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリッング分子により共有結合により結合しているか、あるいは、イオン相互作用、水素結合、フッテルワールス相互作用、疎水の相互作用、および/またはスタッキング相互作用により非共有結合的に結合している。ある態様においては、本発明の s i n A 分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様においては、本発明の s i n A 分子は、標的遺伝子の発現の阻害を引き起こせるように、標的遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用する。本明細書において用いる場合、s i n A 分子は RNA のみを含む分子に限定される必要はなく、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドも包含する。ある態様においては、本発明の短干渉核酸分子は 2'-ヒドロキシ (2'-OH) を含むヌクレオチドを欠失している。本出願人は、ある態様において、RNAi を媒介するために 2'-ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を必要としない短干渉核酸を記載する。すなわち、本発明の短干渉核酸分子は、任意にリボヌクレオチド (例えば、2'-OH 基を有するヌクレオチド) を含まなくてもよい。しかし、RNAi を支持するために s i n A 分子中にリボヌクレオチドの存在を必要としないそのような s i n A 分子は、2'-OH 基を有する 1 またはそれ以上のヌクレオチドを含む、結合したリンカまたは他の結合しているかまたは会合している基、成分、または鎖を有することができる。任意に、s i n A 分子は、ヌクレオチド位置の約 5, 10, 20, 30, 40, または 50 % にリボヌクレオチドを含むことができる。本発明の修飾短干渉核酸分子または、短干渉修飾オリゴヌクレオチド “s i m o n” と称される。本発明の修飾短干渉核酸分子は、s i n A との用語は、配列特異的 RNAi を媒介しうる核酸分子を記述するために用いられる他の用語、例えば、短干渉 RNA (s i r N A), 二本鎖 RNA (dsRNA), イクロ RNA (miRNA), 短ヘパリン RNA (shRNA), 短干渉オリゴヌクレオチド、短干渉核酸、短干渉修飾オリゴヌクレオチド、化学的に修飾された s i r N A, 転写後遺伝子サイレンシング RNA (piRNA), および他のものと同等であることを意味する。さらに、本明細書において用いる場合、RNAi との用語は、配列特異的 RNA 干渉を記述する他の用語、例えば転写後遺伝子サイレンシング、または後成遺伝子 (c p i c o n c i l s) と同等であることを意味する。例えば、本発明の s i n A 分子を用いて、転写後レベルまたは転写前レベルの両方で後成的に遺伝子サイレンシングさせることができる。非限定的例においては、本発明の s i n A 分子による遺伝子発現の後



成制制御は、クロマチン構造の s i n A 媒介性修飾により生じて遺伝子発現を変化させることができる (例えば, A l i s h i r e, 2002, Science, 297, 1818-1819; V o i p e e t a l., 2002, Science, 297, 1833-1837; J e n n e w e i n, 2002, Science, 297, 2215-2218; および H a i l e t a l., 2002, Science, 297, 2232-2237 を参照)。

【0164】

“調節する”とは、遺伝子の発現、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットをコードする RNA 分子または同等の RNA 分子のレベル、または蛋白質または蛋白質サブユニットの1またはそれ以上の活性が、発現、レベル、または活性が、調節剤の非存在下で観察されるより高いかまたは低いように、アッソシエートまたはアッソシエートされ、調節することを意味する。例えば、“調節する”の用語は、“阻害する”ことを意味しうるが、“調節する”の用語の使用はこの定義には限定されない。

【0165】

“阻害する”、“ダウンレギュレートする”、または“減少させる”とは、遺伝子の発現、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットをコードする RNA 分子または同等の RNA 分子のレベル、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットの活性が、本発明の核酸分子 (例えば s i n A) の非存在下において観察されるより低く減少していることを意味する。1つの態様においては、s i n A 分子による阻害、ダウンレギュレーションまたは低下は、不活性または減弱化分子の存在下で観察されるレベルより低い。別の態様においては、s i n A 分子による阻害、ダウンレギュレーション、または低下は、例えば、スクランブル化配列を有するカミヌアツチを有する s i n A 分子の存在下で観察されるレベルより低い。別の態様においては、本発明の核酸分子による遺伝子発現の阻害、ダウンレギュレーション、または低下は、核酸分子の存在下においてその非存在下におけるより大きい。

【0166】

“遺伝子”または“標的遺伝子”とは、RNA をコードする核酸を意味し、例えば、限定されないが、ポリペプチドをコードする構造遺伝子などの核酸配列が含まれる。標的遺伝子は、細胞に由来する遺伝子、内因性遺伝子、トランスジ、または外来遺伝子、例えば、病原体 (例えばウイルス) の感染後に細胞中に存在する病原体の遺伝子でありうる。標的遺伝子を含む細胞は、任意の生物、例えば、植物、動物、原生動物、ウイルス、細菌または真菌に由来するかその中に含まれる。植物の非限定的例には、単子葉植物、双子葉植物、または裸子植物が含まれる。動物の非限定的例には脊椎動物または無脊椎動物が含まれる。真菌の非限定的例には糸状菌または酵母が含まれる。

【0167】

本明細書において用いる場合、“H I V”とは、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) 感染および後天性免疫不全症候群 (A I D S) の進行、発達、または維持に關与する任意のウイルス、蛋白質、ペプチド、ポリペプチド、および/またはポリヌクレオチドを意味し、H I V 遺伝子から発現されるもの、または H I V 感染に關与するもの (例えば、本明細書において G e n b a n k 受託番号で参照されるポリヌクレオチドまたは H I V 遺伝子由来する他の任意の H I V 転写産物) を含む、例えば、ウイルス全体、例えば、H I V - 1, H I V - 2, F I V - 1, S I V - 1; ウイルス成分、例えば、n e f, v i f, t a t, または r e v ウイルス遺伝子産物; および H I V 感染に關与する細胞標的が含まれる。

【0168】

“H I V 蛋白質”とは、任意の H I V ペプチドまたは蛋白質またはそれらの成分を意味し、ここで、ペプチドまたは蛋白質は、H I V 遺伝子によりコードされるか、または H I V 活性を有する。

【0169】

“高度に保存された配列領域”とは、標的遺伝子中の1またはそれ以上の領域のヌクレオ

50

チド配列が、1つの世代と他の世代とで、または1つの生物学的システムと他の生物学的システムとで有意に相違しないことを意味する。

【0170】

“センス領域”とは、s i n A 分子のアンチセンス領域に対する相補性を有する、s i n A 分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、s i n A 分子のセンス領域は、標的核酸配列とホモロジーを有する核酸配列を含むことができる。

【0171】

“アンチセンス領域”とは、標的核酸配列に対する相補性を有する、s i n A 分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、s i n A 分子のアンチセンス領域は、s i n A 分子のセンス領域に対する相補性を有する核酸配列を任意に含むことができる。

【0172】

“標的核酸”とは、その発現または活性が調節されるべき任意の核酸配列を意味する。標的核酸は DNA または RNA でありうる。

【0173】

“相補性”とは、核酸が、伝統的なワトソン-クリックまたは他の非伝統的なタイプのいずれかにより、別の核酸配列と水素結合を形成しうることを意味する。本発明の核酸分子に關して、核酸分子とその相補的配列との結合自由エネルギーは、核酸の適切な機能、例えば、RNA i 活性を進行させるのに十分なものである。核酸分子についての結合自由エネルギーの決定は当該技術分野においてよく知られている (例えば、Turner et al., 1987, CSH Symp. Quant. Biol. 11 pp. 123-133; Frier et al., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9373-9377; Turner et al., 1987, J. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785 を参照)。相補性のパーセンテージは、核酸分子中の、第2の核酸配列と水素結合 (例えば、ワトソン-クリック塩基対形成) を形成しうる連続する残基のパーセンテージを示す (例えば、10塩基中の5、6、7、8、9、10塩基は、50%、60%、70%、80%、90%、および100%の相補性である)。“完全な相補性”とは、核酸配列の連続する残基がすべて第2の核酸配列中の同じ数の連続する残基と水素結合を形成しうることを意味する。

【0174】

本発明の s i n A 分子は、単独または他の治療法と組み合わせ、種々の病理性感染症または他の病気、例えば、H I V 感染または後天性免疫不全症候群 (A I D S)、および細胞または組織における H I V のレベルに關連する他の任意の疾病または病気を治療するための新規な治療方法である。H I V 発現 (特に H I V RNA レベル) の減少、したがって、それぞれの蛋白質のレベルの減少は、疾病または病気の症状をある程度軽減する。

【0175】

本発明の1つの態様においては、本発明の s i n A 分子の各配列は、独立して、約18-約24ヌクレオチドの長さであり、特定の態様においては、約18、19、20、21、22、23、または24ヌクレオチドの長さである。別の態様においては、本発明の s i n A デュプレックスまたは24ヌクレオチドの長さである。約17-約23 (例えば、約17、18、19、20、21、22または23) 塩基対を含む。さらに別の態様においては、ヘアピンまたは環状構造を含む本発明の s i n A 分子は、約35-約55 (例えば、約35、40、45、50または55) ヌクレオチドの長さであるか、または約38-約44 (例えば、約38、39、40、41、42、43または44) ヌクレオチドの長さであり、約16-約22 (例えば、約16、17、18、19、20、21または22) 塩基対を含む。本発明の例示的 s i n A 分子は本明細書に開示される。本発明の例示的合成 s i n A 分子は、表1 I I および I V、および/または図4-5に示される。

【0176】

本明細書において用いる場合、“細胞”は、その通常の生物学的意味で用いられ、多細胞生物全体を指さず、特にヒトを指さない。細胞は生物中で、例えば、鳥類、植物および哺

50

乳動物、例えばヒト、ウシ、ヤギ、無尾サル、有尾サル、ワタ、イヌおよびネコ中で存在することができ、細胞は、原核生物（例えば細菌細胞）または真核生物（例えば哺乳動物または植物細胞）であってもよい。細胞は体細胞起源でも生殖細胞系起源でもよく、全能細胞でも多能性細胞でもよく、分裂していても分裂していてもよい。細胞はまた、配偶子または胚、幹細胞、または完全に分化した細胞に由来するか、またはこれらを含むものであってもよい。

[0177] 本発明の s i n A 分子は、直接加えてもよく、またはカチオン性脂質と複合体化して、リポソーム中に封入して、または他の方法により、標的細胞または組織にデリバリーすることができ、核膜または核被膜複合体は、関連する組織にエクスポートで、または注射、注入ポンプまたはスポンジを用いてインジェクションで、バイオポリマー中に取り込ませてまたは取り込ませずに、局所的に投与することができ、特定の態様においては、本発明の核酸分子は表 1-11 および/または図 4-5 に示される配列を含む。そのような核酸分子の例は、これらの表および図面において規定される配列から本質的になる。さらに、表 1 に記載される化学的に修飾されたコンストラクトを本発明の任意の s i n A 配列に適用することができ、

[0178] 別の観点においては、本発明は本発明の 1 またはそれ以上の s i n A 分子を含む哺乳動物細胞を提供する。1 またはそれ以上の s i n A 分子は、独立して、同じまたは異なる部位を標的とすることができ、

[0179] "RNA"とは、少なくとも 1 つのリボヌクレオチド残基を含む分子を意味する。"リボヌクレオチド"とは、 $\beta$ -D-リボフuranose 成分の 2' 位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。この用語は、二本鎖 RNA、一本鎖 RNA、単離された RNA、例えば部分的に生成された RNA、本質的に純粋な RNA、合成 RNA、組換えられた RNA、または変更に、天然に生ずる RNA と異なるように変更された RNA を含む。そのような変更は、非ヌクレオチド物質の付加、例えば、s i n A の末端または内部（例えば RNA の少なくとも 1 またはそれ以上のヌクレオチド）への付加を含むことができる。本発明の RNA 分子中のヌクレオチドはまた、標準的ではないヌクレオチド、例えば、天然に生じないヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドを含むことができる。これらの変更された RNA は、類似体または天然に生ずる RNA の類似体と称することができる。

[0180] "被験者"とは、外植された細胞の DNA またはレシジェントである生物または細胞それ自体を意味する。"被験者"とはまた、本発明の核酸分子を投与することができる生物を表す。1 つの態様においては、被験者は哺乳動物または哺乳動物細胞である。別の態様においては、被験者はヒトまたはヒト細胞である。

[0181] 本明細書において用いる場合、"ホスホロチオエート"との用語は、式 I（式中、Z および/または W はイオン原子を含む）を有するヌクレオチド間結合を表す。したがって、ホスホロチオエートとの用語は、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートヌクレオチド間結合の両方を表す。

[0182] 本明細書において用いる場合、"万能塩基"との用語は、天然の DNA/RNA 塩基のそれと、これらをほとんど区別せずに塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を表す。万能塩基の非限定的例としては、当該技術分野において知られるように（例えば、L o a k e s, 2001, N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h, 29, 2437, 2447 を参照）、C-フエニル、C-チンチルおよび他の芳香族誘導体、イソジン、アゾールカルボキサミド、およびニトロアゾール誘導体、例えば、3-ニトロピロール、

4-ニトロインドル、5-ニトロインドル、および 6-ニトロインドルが挙げられる。

[0183] 本明細書において用いる場合、"非環状ヌクレオチド"との用語は、非環状リボース糖を有する任意のヌクレオチド、例えば、リボース核酸 (C1, C2, C3, C4, または C5) のいずれかが、独立してまたは組み合わせてヌクレオチド中に存在しないヌクレオチドを表す。

[0184] 本発明の核酸分子は、個別に、または他の薬剤と組み合わせてまたは一緒に、本明細書に記載される疾病または状態（例えば癌および他の増殖性疾患）を治療するために用いることができる。例えば、特定の疾病または状態を治療するために、治療に適した条件下で、s i n A 分子を個別にまたは 1 またはそれ以上の薬剤と組み合わせて被験者に投与することができ、または当業界には明らかな他の適当な細胞に投与することができる。

[0185] さらに別の態様においては、s i n A 分子を他の既知の治療法と組み合わせて用いて、上述の健康状態または疾病を治療することができる。例えば、本明細書に記載される分子を 1 またはそれ以上の既知の治療法と組み合わせて用いて、疾病または健康状態を治療することができ、本発明の s i n A 分子と容易に組み合わせることができる他の治療法の非限定的例は、酵素的核酸分子、アロステリック核酸分子、アンチセンス、デコイ、またはアプタマー核酸分子、抗体、例えばモノクローナル抗体、小分子、および他の有機および/または無機化合物、例えば金属、塩およびイオンである。

[0186] 1 つの態様においては、本発明は、本発明の少なくとも 1 つの s i n A 分子をコードする核酸配列を、その s i n A 分子の発現を可能とするように含む発現ベクターを特徴とする。例えば、ベクターは、デユアプレックスを含む s i n A 分子の両方の鎖をコードする配列を含むことができる。ベクターはまた、自己相補的でありしたがって s i n A 分子を形成する 1 つの核酸分子をコードする配列を含むことができる。そのような発現ベクターの非限定的例は、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology 19, 500; および Novina et al., 2002, Nature Medicine 8, 681-686 に記載されている。

[0187] 別の態様においては、本発明は、本発明の発現ベクターを含む哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞を特徴とする。

[0188] さらに別の態様においては、本発明の発現ベクターは、Genbank 受託番号、例えば本明細書に開示される Genbank 受託番号で表される RNA 分子に対する相補性を有する s i n A 分子の配列を含む。

[0189] 1 つの態様においては、本発明の発現ベクターは、2 またはそれ以上の s i n A 分子をコードする核酸配列を含み、これらは同じであっても異なってもよい。

[0190] 本発明の別の観点においては、標的 RNA 分子と相互作用して、標的 RNA 分子（例えば、本明細書において Genbank 受託番号で表される標的 RNA 分子）をコードする遺伝子をダウンレギュレートする s i n A 分子は、DNA または RNA ベクター中に挿入された転写ユニットから発現される。組換えベクターは、DNA プラスミドまたはウイルスベクターでありうる。s i n A を発現するウイルスベクターは、限定されないが、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはアルファウイルスに基づいて

検疫することができ、s i N A分子を発現しうる組織ペクターは、本明細書に記載されるようにデリバリーされ、標的細胞中に残留する。あるいは、s i N A分子の過剰的発現を与えるウイルスペクターを用いることもできる。そのようなペクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。いったん発現されれば、s i N A分子は結合してRNA干渉(RNAi)により遺伝子機能または発現をダウンレギュレートする。s i N Aを発現するペクターのデリバリーは、全身的(例えば、静脈内または筋肉内投与により)、被験者から外観された標的細胞に投与した後、被験者に再導入することにより、または所望の標的細胞中への導入を可能とする他のいずれかの手段により行うことができる。

【0191】

“ペクター”とは、所望の核酸をデリバリーするために用いられる、任意の核酸および/またはウイルスに基づく手法を意味する。

【0192】

本発明の他の特徴および利点は、以下の本発明の所ましい態様の説明および特許請求の範囲から明らかである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0193】

図面の簡単な説明

図1は、s i N A分子を合成するスキームの非限定的例を示す。相補的s i N A配列鎖である鎖1および鎖2をタンデムで合成し、切断可能な結合、例えばヌクレオチドスラングネットまたは無塩基スラングネットで結合させる。これは、固体支持体上の固相合成において用いられる切断可能なリソカーと同じであっても異なっている。合成は固相でも液相でもよく、示される例においては合成は固相合成である。合成は、タンデムオリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチド上にジメトキシトリチル基等の保護基が現れるように実施する。オリゴヌクレオチドを切断および脱保護するため、末端保護基の性質を利用してデュープレックスを精製することができる。これは、例えば、末端保護基を有するデュープレックス/オリゴヌクレオチドのみが単離されるトリチルオン精製法を適用することにより行うことができる。

【0194】

図2は、本発明の方法により合成された精製s i N AデュープレックスのMALDI-TOF質量分析を示す。示される2つのピークは、別々のs i N A配列鎖の推定質量に対応する。この結果は、タンデム合成から生成されたs i N Aデュープレックスを、単純なトリチルオン精製法を用いて単一物質として精製しうることを示す。

【0195】

図3は、RNAiに關与する標的RNA分解の提唱されるメカニズムの非限定的例を示す図である。外來一本鎖RNA、例えばウイルス、トランスポゾン、または他の外因性RNAからRNA依存性RNAポリメラーゼ(RDRP)により生成される二本鎖RNA(d s RNA)が、ダイサー(DICER)酵素を活性化し、次にこれはs i N Aデュープレックスを生成する。あるいは、合成されたまたは発現されたs i N Aを適当な手段により細胞内に直接導入することができる。活性なs i N A複合体が形成され、これは標的RNAを認識し、その結果、RISCエンブレマラーゼ複合体により標的RNAが分解されるか、またはRNA依存性RNAポリメラーゼ(RDRP)により追加のRNAが合成され、これはダイサーを活性化して追加のs i N A分子が生じ、このことによりRNAi応答が増幅される。

【0196】

図4A-Fは、本発明の化学的に修飾されたs i N Aコンストラクトの非限定的例を示す。図中、Nは任意のヌクレオチド(アデニン、グアニン、シトシン、ウリジン、または任意にチミンジンを表し、例えば、括弧(NN)により表されるオーバーハング領域においてチミンジンを置換されていてもよい。s i N Aコンストラクトのセンス鎖およびアンチセンス鎖について種々の修飾が示されている。

【0197】

図4A: センス鎖は、4個のホスホロチオエート5'、および3'、末端ヌクレオチド間結合を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端3'、ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、任意に3'、末端グリセリル成分を有してもよく、ここで、2個の末端3'、ヌクレオチドは任意に標的RNA配列に相補的であってもよく、1個の3'、末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合および4個の5'、末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有し、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0198】

図4B: センス鎖は21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'、ヌクレオチドは、任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、任意に3'、末端グリセリル成分を有し、存在しうるすべてのヌクレオチドは、任意に標的RNA配列に相補的であってもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0199】

図4C: センス鎖は5'、末端キヤップ成分および3'、末端キヤップ成分を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'、ヌクレオチドは任意に塩基対形成していてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は、21ヌクレオチドを含み、任意に3'、末端グリセリル成分を有し、存在しうるすべてのヌクレオチドは、任意に標的RNA配列に相補的であってもよく、1個の3'、末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有し、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

【0200】

図4D: センス鎖は5'、末端キヤップ成分および3'、末端キヤップ成分を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'、ヌクレオチドは任意に塩基対形成していてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、これは任意に3'、末端グリセリル成分を有し、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これは任意に標的RNA配列に相補的であってもよく、1個の3'、末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有し、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2



・O-メチル修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

[0201]

図4E：センス鎖は5'末端キヤップ成分および3'末端キヤップ成分を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのポリミジンスヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、任意に3'末端クリセリル成分を有しているてもよく、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に標的RNA配列に相補的であつてもよく、存在しうるすべてのポリミジンスヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在しうるすべてのポリミジンスヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、これは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

[0202]

図4F：センス鎖は5'末端キヤップ成分および3'末端キヤップ成分を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのポリミジンスヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、任意に3'末端クリセリル成分を有しているてもよく、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に標的RNA配列に相補的であつてもよく、1個の3'末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有しているてもよく、存在しうるすべてのポリミジンスヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在しうるすべてのポリミジンスヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。コンストラクトAA-Fのアンチセンス鎖は、本発明のいずれかの標的核酸配列に相補的な配列を含む。

[0203]

図5A-Fは、本発明の化学的に修飾された特定のsINA配列の非限定的例を示す。A-Fは、図4A-Fに示される化学的修飾をHIV sINA配列に適用したものである。

[0204]

図6は、本発明の種々のsINAコンストラクトの非限定的例を示す。示される例(コンストラクト1, 2, および3)は典型的な19塩基対を有するが、本発明の異なる塩基対には本明細書に記載される任意の塩基対が含まれる。括弧内の領域は、例えば約1, 2, 3, または4ヌクレオチドの長さ、好ましくは約2ヌクレオチドを含むヌクレオチドオーバーハングを表す。コンストラクト1および2は、RNAi活性用に独立して用いることができる。コンストラクト2は、ポリヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリソナーを含むことができる。これは、任意に、生物分解性リソナーとして設計することができる。1つの態様においては、コンストラクト2に示されるルーブ構造は生物分解性リソナーを含むことができる。このことにより、インビボおよび/またはインビトロでコンストラクト1が形成される。別の例においては、同じ原理でコンストラクト2を生成するためにコンストラクト3を用いることができる。ここで、リソナーはインビボおよび/またはインビトロで活性なsINAコンストラクト2を生成するために用いられ、これは任意に別の生物分解性リソナーを用いてインビボおよび/またはインビトロで活性なsINAコンストラクト1を生成することができる。そのように、sINAコンストラクトの安定性および/または活性は、インビボまたはインビトロで、および/またはインビトロにおいて用いるた

めのsINAコンストラクトの設計に基づいて調節することができる。

[0205]

図7A-Cは、sINAヘアピンコンストラクトを生成するための発現カセットを構築するために用いられるスキームの概略図である。

[0206]

図7A：5'-制限部位(R1)配列、次に予め決定されたHIV標的配列と同一の配列を有する領域(sINAのセンス領域)を含むようにDNAオリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約19, 20, 21, または22ヌクレオチド(N)の長さを有し、その後例えば約3-約10ヌクレオチドを含む規定された配列(X)のルーブ配列を有する。

[0207]

図7B：次に、合成コンストラクトをDNAポリメラーゼにより伸長して、自己相補的配列を有するヘアピン構造を生成し、このことにより、HIV標的配列に対する特異性を有し、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有するsINA転写産物が得られる。

[0208]

図7C：コンストラクトを加熱(例えば約95℃)して、配列を直鎖状とすることにより、第1の鎖の3'-制限配列に対するグライマーを用いて相補的な第2のDNA鎖を伸長することができる。次に、二本鎖DNAを細胞における発現用の適当なベクター中に挿入する。コンストラクトは、例えば、制限部位を設計することにより、および/またはPauli(2002, Nature Biotechnology 29, 505-508)に記載されるようにポリリ末端領域を利用することにより、転写により3'末端ヌクレオチドオーバーハングが生ずるように設計することができる。

[0209]

図8A-Cは、発現カセットを構築して二本鎖sINAコンストラクトを生成するために用いられるスキームの概略図である。

[0210]

図8A：5'-制限(R1)部位配列、次に予め決定されたHIV標的配列と同一の配列を有する領域(sINAのセンス領域)を有するように、DNAオリゴマーを合成すること。ここで、センス領域は、例えば、約19, 20, 21, または22ヌクレオチド(N)の長さを有し、その後規定された配列(X)のルーブ配列に隣接する3'-制限部位(R2)を含む。

[0211]

図8B：次に、合成コンストラクトをDNAポリメラーゼで伸長させて、自己相補的配列を有するヘアピン構造を生成する。

[0212]

図8C：コンストラクトをR1およびR2に特異的な制限酵素で処理して二本鎖DNAを生成し、次にこれを細胞における発現用の適当なベクター中に挿入する。UGプロモーター領域がdsDNAの両側を挟むように転写カセットを設計し、このことによりsINAの別々のセンス鎖およびアンチセンス鎖が生ずる。ポリリ末端領域をコンストラクトに付加して、得られる転写産物中にオーバーハングを生成することができる。

[0213]

図9A-Eは、特定の標的核酸配列、例えばメッセンジャーRNA中のsINA媒介性RNAの標的部位を決定するために用いられる方法の概略図である。

[0214]

図9A：sINAコンストラクトのアンチセンス領域が標的核酸配列の全域で標的部位に対する相補性を有し、センス領域がsINAのアンチセンス領域に相補的な配列を含むよう、sINAオリゴヌクレオチドのプールを合成する。

[0215]

図9BおよびC：配列をプールし、ベクターの細胞中へのトランスフェクションにより

s i N A が発現するように (図 9 C), ベクター中に挿入する (図 9 B)。

【0216】  
図 9 D: 標的核酸配列の調節に伴う表現型の変化に基づいて細胞を分類する。

【0217】

図 9 E: 分類された細胞から s i N A を単離し、シーケンスして、標的核酸配列中の有効な標的部位を同定する。

【0218】

図 10 は、例えば、本発明の s i N A 配列の 3' 末端を安定化させるために用いることができる、種々の安定化化学 (1-10) の非限定的例を示す: (1) [3'-3']-反転デオキシリボース; (2) デオキシリボスチオチド; (3) [5'-3']-3'-デオキシリボスチオチド; (4) [5'-3']-リボスチオチド; (5) [5'-3'-3']-3'-デオキシリボスチオチド; (6) 3'-グリセリル; (7) [3'-5']-3'-デオキシリボスチオチド; (8) [3'-3']-デオキシリボスチオチド; (9) [5'-2']-デオキシリボスチオチド; および (10) [5'-3']-デオキシリボスチオチド。図面に示されている修飾および非修飾の骨格化学に加えて、これらの化学を本明細書に記載されるような別の骨格修飾、例えば、式 I を右する骨格修飾と組み合わせることができる。さらに、示される末端修飾の 5' 側に示される 2'-デオキシスチオチドは、本明細書に記載される別の修飾または非修飾スチオチドまたは非スチオチド、例えば、式 I-VII またはそれらの任意の組み合わせを有する修飾であってもよい。

【0219】

図 11 は、ヌクレアゼに耐性であるが RNAi 活性を媒介する能力を保持している本発明の化学的に修飾された s i N A コンストラクトを同定するために用いる戦術の非限定的例を示す。経験に基づき設計パラメータ (例えば、2'-修飾、塩基修飾、骨格修飾、末端キャップ修飾等の導入) に基づいて s i N A コンストラクトに化学修飾を導入する。修飾されたコンストラクトを適当な系 (例えば、示されるようにヌクレアゼ耐性についてはヒト血清、または PK/デリバリーベラメータについては動物モデル) で試験する。平行して、例えば、細胞培養系において、例えば、ルシフェラーゼ reporter を有するが RNAi 活性を保持しているリポ s i N A コンストラクトを同定し、これをさらに修飾し、再びアッセイする。この同じ方法を用いて、改良された薬物動態学的プロファイル、デリバリー、および RNAi 活性を有する s i N A-コンジュゲート分子を同定することができる。

【0220】

本発明の詳細な説明

以下の議論は、現在知られている短干渉 RNA により媒介される RNA 干渉の提唱されるメカニズムを記載するが、限定を意味するものではなく、先行技術であると認めるものではない。本出願人は、本明細書において、化学的に修飾された短干渉核酸が s i N A 分子と類似のまたは改良された RNAi 媒介能力を有し、インビボで改良された安定性および活性を有すると予測されることを示す。したがって、この議論は、s i N A のみに限定されることを意味するものではなく、s i N A 全体に適用することができ、"RNAi" を媒介する改良された能力"または"改良された RNAi 活性"とは、インビボおよび/またはインビボで測定された RNAi 活性を含むことを意味し、ここで、RNAi 活性は s i N A が RNAi を媒介する能力と本発明の s i N A の安定性との両方を反映する。本発明においては、これらの活性の積を、全 RNAi s i N A または複数のリボヌクレオチドを含む s i N A と比較して、インビトロおよび/またはインビボで増加させることができる。場合によっては、s i N A 分子の活性または安定性は低下するかもしれないが (すなわち、10 分の 1 以下)、s i N A 分子の全体的活性はインビトロおよび/またはインビボで増強される。

【0221】

RNA 干渉とは、動物において短干渉 RNA (s i R N A) により媒介される配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを表す (Fire et al., 1998, Nature, 391, 806)。植物における対応するプロセスは一般に転写後遺伝子サイレンシングまたは RNAi サイレncing と称され、真核においてはクエンチングとも称される。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を防止するために用いられる進化的に保存された細胞防御メカニズムであると考えられており、異なる態および門が共通して有している (Fire et al., 1999, Trends Genetics, 15, 358)。そのような外来遺伝子発現からの防御は、ウイルス感染または宿主ゲノム中へのトランスポゾン要素のランダムインテグレーションから生ずる二本鎖 RNA (dsRNA) の生成に依存して、相同的一本鎖 RNA またはウイルスゲノム RNA を特異的に破壊する細胞応答により進化してきたのである。細胞における dsRNA の存在は、まだ完全には特性決定されていないメカニズムにより、RNAi 応答を引き起こす。このメカニズムは、蛋白質キナーゼ PKR および 2', 5'-オリゴデニレートシトセターゼの dsRNA 媒介性活性化の結果、リボヌクレアゼ II による mRNA の非特異的切断が生ずるインターフェロン応答とは異なるようである。

【0222】

細胞中に長い dsRNA が存在すると、ダイサーと称されるリボヌクレアゼ II 酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNA をプロセッシングして短干渉 RNA (s i R N A) として知られる短い断片の dsRNA とすることに関与している (Bershtein et al., 2001, Nature, 409, 363)。ダイサー活性から生ずる短干渉 RNA は、典型的には約 21-23 ヌクレオチドの長さであり、約 19 塩基対のデュエレーションを含む。ダイサーはまた、翻訳制御における関与が示されている保存された構造の前駆体 RNA から 21 および 22 ヌクレオチドの小さな一時的 RNA (s i R N A) を切り出すことに関与することが示唆されている (Huivagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi 応答はまた、一般に RNA 誘導性サイレンシング複合体 (RISC) と称される、s i R N A を含むエンゾヌクレアゼ複合体を特徴とし、これは s i R N A と相同な配列を有する一本鎖 RNA の切断を媒介する (Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。さらに、RNA 干渉には、小さい RNA (例えば、マイクロ RNA または miRNA) に媒介される遺伝子サイレンシングが関与する場合もある。これはおそらくは、クロマチン構造を制御する細胞性メカニズムによるものであり、このことにより標的遺伝子配列の転写が妨害される (例えば、Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jennewein, 2002, Science, 297, 2215-2218; および Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237 を参照)。このように、本発明の s i N A 分子は、RNA 転写産物との相互作用を介して、あるいは特定の遺伝子配列との相互作用により、遺伝子サイレンシングを媒介するために用いることができ、そのような相互作用により転写レベルまたは転写後レベルのいずれかで遺伝子サイレンシングが生ずる。

【0223】

RNAi は種々の系で研究されてきた。Fire (1998, Nature, 391, 806) は、C. Elegans において最初に RNAi を観察した。Wianny および Goetz (1999, Nature Cell Biol., 2, 70) は、マウス胚において dsRNA により媒介される RNAi を記載する。Hammond (2000, Nature, 404, 293) は、dsRNA でトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞における RNAi を記載する。Elbashir (2001, Nature, 411, 494) は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞および HeLa 細胞において、合成の 21 ヌクレオチド RNA のデュエレーションを導入することにより誘

導されるRNAiを記載する。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究は、効率的なRNAi活性を媒介するために必須であるsRNAの長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、21ヌクレオチドのsRNAデュープレックスは2つの2ヌクレオチド3'末端ヌクレオチド（オーバーハング）を含む場合に最も活性であることを示した。さらに、一方または両方のsRNA鎖を2'-デオキシまたは2'-オメチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が破壊されるが、3'末端sRNAヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換することは許容されることと示された。sRNAデュープレックスの中心におけるミスマッチ配列もまたRNAi活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、標的RNAにおける切断部位の位置はsRNAガイド配列の3'末端ではなく5'末端により規定されることを示した（Eibashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877）。他の研究は、sRNAデュープレックスの標的相補鎖の5'-リン酸がsRNA活性に必要であり、sRNAの5'-リン酸成分を維持するためにATPが用いられることを示したが（Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309）。5'-リン酸を欠失したsRNAは外的に増入したときに活性であり、このことは、インビボでsRNAコンストラクトの5'-リン酸化が生じているかもしれないことを示唆する。

#### 【0224】

##### 核糖分子の合成

100ヌクレオチドを超える長さの核糖の合成は、自動化方法を用いては困難であり、そのような分子の合成コストは非常に高くなる。本発明においては、好ましくは、小さい核糖モチーフ（“小さい”とは、100ヌクレオチド以下の長さ、好ましくは80ヌクレオチド以下の長さ、最も好ましくは50ヌクレオチド以下の長さの核糖モチーフ、例えば、別々のsRNAオリゴヌクレオチド配列またはタンデムで合成されたsRNA配列を表す）が外的なリンターに用いられる。これらの分子は構造が簡単であるため、核糖が蛋白質および/またはRNA構造の標的領域に導入する能力が高い。本発明の例示的分子は化学的に合成するが、他の分子も同様に合成することができる。

#### 【0225】

オリゴヌクレオチド（例えば、ある種の修飾オリゴヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを欠失しているオリゴヌクレオチドの一部）は、例えば、Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 108, 211, 3-19, Thompson et al., 国際公開99/54459, Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684, Wincott et al., 1997, Methods Mol. Biol., 74, 59, Brennan et al., 1998, Biotechnology Bioeng., 61, 33-45, およびBrennan, 米国特許6,001,311に記載されるような、当該技術分野において知られるプロトコルを用いて合成する（これらの文献はすべて本明細書の一部としてここに引用する）。オリゴヌクレオチドの合成は、一般の核酸保護基およびカップリング基、例えば5'末端にジメトキシトリチル、および3'末端にホスホアミダイトを用いて行う。非限定的例においては、394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で、0.2μmolスケールのプロトコルで、2'-オメチル化ヌクレオチドについては2.5分間のカップリング工程、および2'-デオキシヌクレオチドまたは2'-フルボキシ-2'-フルボキシヌクレオチドについては45秒間のカップリング工程で、小スケールの合成を行う。表Vは、合成サイクルで用いる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは、0.2μmolスケールでの合成は、96ウェルプレート合成機、例えば、Photogene (Palo Alto, CA) により製造される装置で、サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。2'-オメチル化ヌクレオチドの各カップリングサイクルにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシルに対して33倍過剰（60μLの0.11M=6.6μmol）の2'-オメチルホスホアミダイトおよび105倍過剰のS-エチルトリチル（60μLの0.25M=15

μmol）を用いることができる。デオキシ残基の各カップリングサイクルにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシルに対して22倍過剰（40μLの0.11M=4.4μmol）のデオキシホスホアミダイトおよび70倍過剰のS-エチルトリチル（40μLの0.25M=10μmol）を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング吸収率は、トリチル画分の比色定数により決定し、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下のとおりである：脱トリチル化溶液は塩化メチレン中3%TCA（AB1）であり；キヤピングは、THF中16%N-メチルイミダゾール（AB1）およびTHF中10%無水酢酸/10%2,6-ルチジン（AB1）中で行い；酸化溶液は、THF中16.9mmol/L, 49mmol/L, 9%水（PERSEPTIVE（登録商標））である。Burdick & Jackson 合成等級アセトニトリルは試薬瓶から直接用いる。S-エチルトリチル溶液（アセトニトリル中0.25M）は、American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは、ホスホアミダイト結合の導入のためには、ボリマー結合試薬（3H-1,2-ペンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキシド, アセトニトリル中0.05M）を用いる。

#### 【0226】

DNA系オリゴヌクレオチドの脱保護は以下のように行う：ボリマー結合トリチルオリゴヌクレオチドを4mLのガラスねじ蓋バイアルに移し、4.0%水性メチルアミン（1mL）の溶液中で65℃で10分間加熱する。20℃に冷却した後、上清をボリマー支持体から取り出す。支持体を1.0mLのEtOH:MeCN:H<sub>2</sub>O/3:1:1で3回洗浄し、ボルテックスし、次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む合わせた上清を乾燥して、白色粉末を得る。

#### 【0227】

本発明のある種のsRNA分子を含むRNAについて用いられる合成方法は、Usmanら（1987, J. Am. Chem. Soc., 109, 7845）、Scarlingら（1990, Nucleic Acids Res., 18, 5433）およびWincottら（1995, Nucleic Acids Res., 23, 2677-2684）、Wincottら（1997, Methods Mol. Biol., 74, 59）に記載の方法にいたが、慣用の核酸保護基およびカップリング基、例えば、5'末端にジメトキシトリチル、および3'末端にホスホアミダイトを用いて行う。非限定的例においては、小スケールの合成は、394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で、改変した0.2μmolスケールのプロトコルを用いて、アルキルシリル保護ヌクレオチドについては7.5分間のカップリング工程を、2'-オメチル化ヌクレオチドについては2.5分間のカップリング工程を行う。表Vは、合成サイクルにおいて用いる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは、0.2μmolスケールでの合成は、96ウェルプレート合成機、例えば、Photogene (Palo Alto, CA) により製造される装置で、サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。2'-オメチル化ヌクレオチドの各カップリングサイクルにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシルに対して33倍過剰（60μLの0.11M=6.6μmol）の2'-オメチルホスホアミダイトおよび75倍過剰のS-エチルトリチル（60μLの0.25M=15μmol）を用いることができる。リボ残基の各カップリングサイクルにおいては、ボリマー結合5'-ヒドロキシルに対して66倍過剰（120μLの0.11M=13.2μmol）のアルキルシリル（リボ）保護ホスホアミダイトおよび150倍過剰のS-エチルトリチル（120μLの0.25M=30μmol）を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング吸収率は、トリチル画分の比色定数により決定し、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下のとおりである：脱トリチル化溶液は塩化メチル

ン中3% TCA (ABI) であり; キヤピドンジは, THF 中16% N-メチルイミダゾール (ABI) および THF 中10% 無水酢酸/10% 2,6-ルチジン (ABI) 中で行い; 酸化溶媒は, THF 中16.9 mM  $I_2$ , 4.9 mM ビリジン, 9% 水 (PERS EPTIVE (登録商標)) である。Burdick & Jackson 合成等級アセトニトリルは試薬瓶から直接用いる。S-エチルチトラーゾール溶液 (アセトニトリル中0.25 M) は, American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは, ホスホロチオエーtert結合の導入のためには, ポリケージ試薬 (3H-1,2-ベンゾシチオール-3-オン1,1-ジオキシド, アセトニトリル中0.05 M) を用いる。

[0228] RNA の脱保護は, 2ポットアロトコルまたは1ポットアロトコルのいずれかを用いて行う。2ポットアロトコルについては, ポリマー結合トリチルオソリゴリボヌクレオチドを4 mL のガラスねじ蓋バイアルに移し, 40% 水性メチルアミン (1 mL) の溶液中で65°C で10分間懸濁する。-20°C に冷却した後, 上清をポリマー支持体から取り出す。支持体を1.0 mL の EtOH:MeCN:H<sub>2</sub>O/3:1:1 で3回洗浄し, ボルテックスし, 次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む洗浄した上清を乾燥して, 白色粉末を得る。塩基脱保護オリゴリボヌクレオチドを無水TEA/HF/NMP 溶液 (1.5 mL N-メチルピロリジン, 750  $\mu$ L TEA および1.0 mL TEA $\cdot$ 3HF の溶液300  $\mu$ L, HF 濃度1.4 M) に再懸濁し, 65°C に加熱する。1.5時間後, オリゴマーを1.5 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> で反応を停止させる。

[0229] あるいは, 1ポットアロトコルのためには, ポリマー結合トリチルオソリゴリボヌクレオチドを4 mL のガラスねじ蓋バイアルに移し, 33% エタノール性メチルアミン/DMSO:1/1 (0.8 mL) の溶液中で, 65°C で15分間懸濁する。バイアルを室温にする。TEA $\cdot$ 3HF (0.1 mL) を加え, バイアルを65°C で15分間加熱する。試料を-20°C に冷却し, 次に1.5 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> で反応を停止させる。

[0230] トリチルオソリゴマーの精製のためには, 停止したNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液を, アセトニトリル, 続いて50 mM TEA で予備洗浄したC-18 含有カトリッジに負荷する。負荷したカトリッジを水で洗浄した後, RNA を0.5% TFA で13分間脱トリチル化する。次にカトリッジを水で再び洗浄し, 1 M NaCl で塩交換し, 再び水で洗浄する。次に, 30% アセトニトリルでオリゴヌクレオチドを溶出する。

[0231] 平均段階カッピング収率は, 典型的には>98% である (Wincott et al., 1995 Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684)。当業者は, 合成のスケールは, 上述の例より大きくまたは小さく, 例えば, 限定されないが, 96ウェルのマイクロプレートに適合させることができると認識するであろう。

[0232] あるいは, 本発明の核酸分子は, 別々に合成して, 合成後に例えばライゲーションにより (Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al., 国際公開WO93/23569; Shabarova et al., 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Beilinson et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides 16, 951; Beilinson et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, Beilinson et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204), または合成および/または脱保護の後にハイブリダイゼーションにより, 一緒につなげてよい。

[0233] 本発明の siNA 分子はまた, 本明細書の実施例1に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では, 両方の siNA 鎖を, 切断可能なリソナー

により分離された単一の連続するオリゴヌクレオチドフラグメントまたは鎖として合成し, 次にこれを切断して別々の siNA フラグメントまたは鎖を生成し, これはハイブリダイズして siNA デュエーラックの複製を可能とする。リソナーはオリゴヌクレオチドリソナーであったり非ヌクレオチドリソナーであってもよい。本明細書に記載される siNA のタンデム合成は, ヴァルチウエル/ヴァルチアレット合成フラットフォーム, 例えば96ウェルまたは同様のより大きなヴァルチウエルフラットフォームのいずれにも容易に適合させることができる。本明細書に記載される siNA のタンデム合成はまた, バッチリアクター, 合成カラムなどを用いる大規模合成フラットフォームにも容易に適合させることができる。

[0234] siNA 分子はまた, 一方のフラグメントがRNA分子のセンス領域を含み, 第2のフラグメントがアンチセンス領域を含む2つの別々の核酸鎖またはフラグメントから組み立ててもよい。

[0235] 本発明の核酸分子は, 広範囲に修飾して, スケレアーゼ耐性基, 例えば, 2'-アミノ, 2'-C-アリル, 2'-フルオロ, 2'-O-メチル, 2'-H による修飾により安定性を高めることができる (概説として, Usman and Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163 を参照)。siNA コンストラクトは, 一般的な方法を用いてゲル電気泳動により精製するか, または高速液体クロマトグラフィー (HPLC; Wincott et al., (上掲) を参照, その全体を本明細書の一部としてここに引用する) により精製し, 水に再懸濁する。

[0236] 本発明の別の観点においては, 本発明の siNA 分子は, DNA または RNA ベクター中に挿入された転写ユニットから発現される。組換えベクターは, DNA フラスミドまたはウイルスベクターでありうる。siRNA を発現するウイルスベクターは, 限定されないが, アデノ随伴ウイルス, レトロウイルス, アデノウイルスまたはアルファウイルスに基づいて構築することができる。siNA 分子を発現しうる組換えベクターを本明細書に記載されるようにデリバリーし, 標的細胞中に残留させることができる。あるいは, siNA 分子の過剰的発現を与えるウイルスベクターを用いてもよい。

[0237] 本発明の核酸分子の活性の最適化

修飾 (塩基, 糖および/またはリン酸) を有する化学的に合成した核酸分子は, 血清リボヌクレアーゼによる分解を防止することができる。このことによりその抗力を高めることができる (例えば, Rckstein et al., 国際公開WO92/07065; Perrault et al., 1990 Nature 344, 565; Piatek et al., 1991 Science 253, 314; Usman and Cedergren, 1992 Trends in Biochem. Sci. 17, 334; Usman et al., 国際公開WO93/15187; Rossi et al., 国際公開WO91/03162; Sproat, 米国特許5, 334, 711; Gold et al., US6, 300, 074 および Burgin et al., (上掲) を参照 (これらはすべて本明細書の一部としてここに引用する)。上述の参考文献はすべて, 本明細書に記載される核酸分子の塩基, リン酸および/または糖成分になしうる種々の化学修飾を記載する。細胞中におけるその抗力を増強するよう修飾し, およびオリゴヌクレオチドの合成時間を短縮し化学物質の必要性を減少するために核酸分子から塩基を除去することが望ましい。

[0238] 当該技術分野には, そのヌクレアーゼ安定性および効力を有意に増強することができる核酸分子中に導入することができる糖, 塩基およびリン酸修飾を記述するいくつもの例がある。例えば, オリゴヌクレオチドは, スケレアーゼ耐性基, 例えば, 2'-アミノ,

2'-C-アリル, 2'-フルオロ, 2'-O-メチル, 2'-O-アリル, 2'-H等のヌクレオチド塩基修飾で修飾することにより, 安定性を高め, および/または生物学的活性を増強するために修飾される(総説については, Usman and Cedergren, 1992; TIBS 17, 34; Usman et al., 1994; Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163; Burgin et al., 1996; Biochemistry 35, 14090を参照)。核酸分子の精修は, 当該技術分野において広く記載されている(Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; Perrault et al., Nature 1990, 344, 565-568; Pieken et al., Science 1991, 253, 314-317; Usman and Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 1992, 17, 334-339; Usman et al., 国際公開WO93/15187; Sproal, 米国特許5,334,711; Beigelman et al., 1995; J. Biol. Chem. 270, 25702; Beigelman et al., 国際公開WO97/26270; Beigelman et al., 米国特許5,716,824; Usman et al., 米国特許5,627,053; Woolf et al., 国際公開WO98/13526; Thompson et al., 米国特許出願60/082,404(1998年4月20日出願); Karpelsky et al., 1998, Tetrahedron Lett., 39, 1131; Earnshaw and Gait, 1998, Biochemistry (Nucleic Acid Sciences), 48, 39-55; Verma and Eckstein, 1998, Annu. Rev. Biochem., 67, 99-134; およびBurlina et al., 1997, Biochem. Med. Chem., 5, 1999-2010を参照, これらの参考文献はすべて, その全体を本明細書の一部としてここに引用する)。これらの刊行物は, 触媒活性を改良することなく, 糖, 塩基および/またはリン酸修飾等を核酸分子中に組み込む位置を決定する一般的な方法および戦略を記載しており, 本明細書の一部としてここに引用する。このような教示の観点から, siNAが細胞においてRNAiを促進する能力が有意に阻害されない限り, 本明細書に記載されるように, 同様の修飾を用いて本発明のsiNA核酸分子を修飾することができ。

#### [0239]

ホスホロチオエート, ホスホロジチオエート, および/または5'-メチルホスホネート結合によるオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合の化学修飾は安定性を改良するが, 過剰な修飾はある種の毒性または活性の低下を引き起こしうる。したがって, 核酸分子を設計する場合, これらのヌクレオチド間結合の量は最小にすべきである。これらの結合の濃度を減少させると, 毒性が低下し, これらの分子の効力が増加し特異性が高くなるはずである。

#### [0240]

活性を維持または増強する化学的修飾を有する短干渉核酸(sRNA)分子が提供される。そのような核酸はまた, 一般に非修飾核酸よりヌクレオチドに対する親和性が高い。したがって, インビトロおよび/またはインビボで活性は顕著に低下しないはずである。調節が目的である場合には, 外的にデリバリーされる治療核酸分子は, 最適には, 望ましくない蛋白質のレベルが低下するのに充分長い時間遅延的RNAの細胞から細胞まで細胞内で安定であるべきである。この時間には, 疾病の状態により数時間から数日まで様々である。RNAおよびDNAの化学合成における進歩(Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677; Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19 (本明細書の一部としてここに引用する))により, 上述のようにヌクレオチド修飾を導入してそのヌクレオチド安定性を高めることにより, 核酸分子を改変する可能性が拡大した。

#### [0241]

1つの態様においては, 本発明の核酸分子は, 1またはそれ以上(例えば, 約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)のGクランアヌクレオチドを含む。Gクランアヌクレオチドは, 修飾シトシン類似体であり, ここで, 修飾は, デーザグレスの間の相補的グアニンのワットソン-クリックおよびフーグスチーソン面の両方の水素結合の能力を与える。例えば, Lin and Matteucci, 1998, J. Am. Chem. Soc., 120, 8531-8532を参照。オリゴヌクレオチド中の単一のGクラン類似体置換により, 相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイスしたときならせん熱安定性およびミスマッチ識別性を実質的に増強することができ。そのようなヌクレオチドを本発明の核酸分子中に取り込ませることにより, 核酸的の相補的配列またはシリアル鎖に対する親和性および特異性の両方が増強される。別の態様においては, 本発明の核酸分子は1またはそれ以上(例えば, 約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)のLNA"ロック"核酸"ヌクレオチド, 例えば, 2', 4'-Cメチレンビシクロヌクレオチドを含む(例えば, Wengel et al., 国際公開WO00/66604およびWO99/14226を参照)。

#### [0242]

別の態様においては, 本発明のsiNA分子のコンジュゲートおよび/または複合体を特徴とする。そのようなコンジュゲートおよび/または複合体は, 生物学的シスラム, 例えば細胞へのsiNA分子のデリバリーを容易にするために用いることができる。本発明により提供されるコンジュゲートおよび複合体は, 治療用化合物を細胞膜を超えて輸送し, 薬物動態学を変更し, および/または本発明の核酸分子の局在化を調節することにより, 治療的活性を付与することができ。本発明は, 分子, 例えば, 限定されないが, 小分子, 脂質, リン脂質, ヌクレオチド, 核酸, 抗体, トキシン, 負に荷電したポリマーおよび他のポリマー, 例えば, 蛋白質, ペプチド, ホルモン, 炭水化物, ポリエチレングリコール, またはポリアミンを, 細胞膜を横切ってデリバリーするための, 新規コンジュゲートおよび複合体の設計および合成を含む。一般に, 記載されるコンジュゲートは, 個々にまたは多成分系の一部として, 分解性リソカー付きでまたはなしで用いるよう設計される。これらの化合物は, 血管の存在下または非存在下で, 本発明の核酸分子を異なる組織に由来する多数の細胞タイプにデリバリーおよび/または局在化することを実現すると予測される(Sullenger and Czech, 米国特許5,854,038を参照)。本明細書に記載される分子のコンジュゲートは, 生物分解性のリソカー, 例えば生物分解性核酸リソカー分子を介して, 生物学的に活性な分子に結合させることができる。

#### [0243]

本明細書において用いる場合, "生物分解性リソカー"との用語は, 1つの分子を別の分子に, 例えば, 生物学的に活性な分子を本発明のsiNA分子に, または本発明のsiNA分子のセンサ領域とアンチセンス領域とを接続するための生物分解性リソカーとして設計される核酸または非核酸リソカー分子を表す。生物分解性リソカーは, 特定の目的, 例えば特定の組織または細胞タイプへのデリバリーのためにその安定性を調節することができるように設計する。核酸に基づく生物分解性リソカー分子の安定性は, リボヌクレオチド, デオキシリボヌクレオチド, および化学的に修飾されたヌクレオチド, 例えば, 2'-O-メチル, 2'-フルオロ, 2'-アミノ, 2'-O-アミノ, 2'-C-アリル, 2'-O-アリル, および他の2'-修飾または塩基修飾ヌクレオチドの種々の組み合わせを用いることにより調節することができ。生物分解性核酸リソカー分子は, タイマー, トリマー, テトラマー, またはより長い核酸分子, 例えば, 約2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, または20ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドであることができ, またはリン酸に基づく結合, 例えば, ホスホルアミドレートまたはホスホエスチル結合を有する単一のヌクレオチドを含むことができる。生物分解性核酸リソカー分子はまた, 核酸骨格, 核酸糖, または核酸塩基修飾を含むことができる。

#### [0244]



本明細書において用いる場合、“生物分解性”との用語は、生物学的システムにおける分解、例えば酵素的分解または化学的分解を表す。

【0245】  
本明細書において用いる場合、“生物学的に活性な分子”との用語は、システムにおいて生物学的応答を増加するかまたは調節することができ、あるいは化学物質または分子を表す。本発明により提供または他の分子との組み合わせで企図される生物学的に活性な s i n A 分子の非限定的例としては、治療上活性な分子、例えば、抗体、ホルモン、抗ウイルス剤、ペプチド、蛋白質、化学療法剤、小分子、ビタミン、補因子、ヌクレオチド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素、核酸、アミノ酸、核酸、トリプレックス形成オリゴヌクレオチド、2, 5-アキヌ、s i n A, d s r n A, アロザイム、アタマ、デコイおよびこれらの類似体が含まれる。本発明の生物学的に活性な分子には、他の生物学的に活性な分子の薬物動態学および/または薬力学を調節することができ、例えば、脂質およびポリマー、例えば、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコールおよび他のポリマーも含まれる。

【0246】  
本明細書において用いる場合、“リン脂質”との用語は、少なくとも1つのリン基を含む疎水性分子を表す。例えば、リン脂質は、リン酸含有基および飽和または不飽和アルキル基を含むことができ、これは、O H, C O O H, オキリ、アミド、または置換もしくは未置換アリール基で任意に置換されていてもよい。

【0247】  
外的にデリバリ—された治療用核酸分子（例えば、s i n A 分子）は、最適には、RNA 転写産物のレベルが低下するに充分長い時間 RNA の逆転写が調節されるまで細胞内で安定であるべきである。核酸分子は、有効な細胞内治療用薬剤として機能するために、ヌクレオチドに耐性である。本明細書におよび当該技術分野において記載される核酸分子の化学合成の改良により、上述したように、ヌクレオチド修飾を導入してそのヌクレオチド安定性を増強させることにより、核酸分子を修飾する可能性が拡大した。

【0248】  
さらに別の態様においては、RNA i に関与する蛋白質の酵素活性を維持するかまたは増強させる化学的修飾を有する s i n A 分子が提供される。そのような核酸は、一般に非修飾核酸およびヌクレオチドに対してより耐性が高い。したがって、インビトロおよび/またはインビボで、活性は顕著に低下しないであろう。

【0249】  
本発明の核酸分子の使用は、組み合わせ療法の可能性を提供することにより、疾病の進行のよりよい治療につながるであろう（例えば、異なる遺伝子とする多数の s i n A 分子、既知の小分子阻害剤とカプソリンゲさせた核酸分子、または分子（異なる酵素的核酸分子モチーフを含む）および/または他の化学的または生物学的分子の組み合わせによる相欠的治療）。s i n A 分子を用いる治療者の治療にはまた、異なる種類の核酸分子、例えば、酵素的核酸分子（リボザイム）、アロザイム、アミノ酸、2, 5-アアオリゴデニレート、デコイ、およびアタマ—の組み合わせが含まれる。

【0250】  
別の観点においては、本発明の s i n A 分子は、1またはそれ以上の5' および/または3'—キヤップ構造を、例えばセンサ s i n A 鎖のみに、アミノ酸 s i n A 鎖のみに、または両方の s i n A 鎖に含む。

【0251】  
“キヤップ構造”とは、オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に組み込まれている化学的修飾を意味する（例えば、Adamal et al., 米国特許5, 998, 203（本明細書の一部としてここに引用）を参照）。これらの末端修飾は、核酸分子をエキソヌクレアーゼ分解から保護し、デリバリ—および/または細胞中の局在化を助けるであろう。キヤップは5' 末端（5'—キヤップ）に存在してもよく、または3' 末端（3'—キヤップ）に存在してもよく、両方の末端に存在してもよい。非限定的例においては、

5'—キヤップは、グリセリル、反転デオキシ無塩基糖基（成分）：4', 5'—メチルヌクレオチド；1—（ベータ-D-エリスロフラノシル）ヌクレオチド；4'—チオヌクレオチド；炭素環式ヌクレオチド；1, 5—アミノヒドロキシトルヌクレオチド；リヌクレオチド；アルファ—ヌクレオチド；修飾糖基ヌクレオチド；ホスホロジチオエー結合；スレオ—ペンツラノシルヌクレオチド；非環状3', 4'—セコヌクレオチド；非環状3, 4—ジヒドロキシフルヌクレオチド；非環状3, 5—ジヒドロキシフルヌクレオチド；3', 3'—反転ヌクレオチド成分；3', 3'—反転無塩基成分；1, 4—アタジン—ルン酸；3'—ホスホロアミド；ヘキシルリン酸；アミノヘキシルリン酸；3'—リン酸；3'—ホスホロチオエー；ホスホロジチオエー；または架橋または非架橋ヌクレオスホネート成分からなる群より選択される。

【0252】  
非限定的例においては、3'—キヤップは、例えば、グリセリル、反転デオキシ無塩基糖基（成分）：4', 5'—メチルヌクレオチド；1—（ベータ-D-エリスロフラノシル）ヌクレオチド；4'—チオヌクレオチド；炭素環式ヌクレオチド；5'—アミノ—アルキルリン酸；1, 3—ジアミノ—2—アロビリン酸；3—アミノアロビリン酸；6—アミノヘキシルリン酸；1, 2—アミノ—2—アロビリン酸；ヒドロキシフルリン酸；1, 5—アミノヒドロキシフルヌクレオチド；スレオ—ペンツラノシルヌクレオチド；修飾糖基ヌクレオチド；ホスホロジチオエー；スレオ—ペンツラノシルヌクレオチド；非環状3', 4'—セコヌクレオチド；3, 4—ジヒドロキシフルヌクレオチド；3, 5—ジヒドロキシフルヌクレオチド；5', 5'—反転ヌクレオチド成分；5', 5'—反転無塩基成分；5', 5'—アミド；架橋および/または非架橋5', 5'—ホスホロアミド；ホスホロチオエーおよび/またはホスホロジチオエー、架橋または非架橋ヌクレオスホネートおよび5'—メルカプト成分からなる群より選択される（より詳細には、Beaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925（本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。

【0253】  
“非ヌクレオチド”との用語は、1またはそれ以上のヌクレオチドユニットの代わりに核酸鎖中に導入することができ、糖および/またはリン酸置換のいずれかを含み、残りの塩基がその酵素的活性を発揮することを可能とする任意の基または化合物を意味する。基または化合物は、一般に認識されているヌクレオチド塩基、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミンを含み、したがって1' 位に塩基を欠失している場合、無塩基である。

【0254】  
“アルキル”基とは、飽和脂肪族炭化水素を表し、直鎖、分枝鎖、および環状アルキル基が含まれる。好ましくは、アルキル基は1—12個の炭素を有する。より好ましくは、これは1—7個の炭素、より好ましくは1—4個の炭素を有する低級アルキルである。アルキルは置換されていてもされなくてもよい。置換されている場合、置換基は、好ましくは、ヒドロキシ、シロ、アルコキシ、=O, =S, NO<sub>2</sub>、またはN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、アミノ、またはSHである。この用語は、また、少なくとも1つの炭素—炭素二重結合を含む不飽和炭化水素基であるアルケニル基を含み、直鎖、分枝鎖、および環状基を含む。好ましくは、アルケニル基は1—12個の炭素を有する。より好ましくは、これは1—7個の炭素原子、より好ましくは1—4個の炭素原子の低級アルケニルである。アルケニル基は置換されていてもされなくてもよい。置換されている場合、置換基は、好ましくは、ヒドロキシ、シロ、アルコキシ、=O, =S, NO<sub>2</sub>、ハロゲン、N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、アミノ、またはSHから選択される。“アルキル”との用語はまた、少なくとも1つの炭素—炭素三重結合を含む不飽和炭化水素基を有するアルキニル基を含み、直鎖、分枝鎖、および環状基を含む。好ましくは、アルキニル基は1—12個の炭素を有する。より好ましくは、これは1—7個の炭素、より好ましくは1—4個の炭素を有する低級アルキニル

である。アルキニル基は、置換されていてもされなくてもよい。置換されている場合、置換基は、好ましくは、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、 $=O$ 、 $=S$ 、 $NO_2$ または $N(CH_3)_2$ 、アミノまたはSHである。

[0255]

そのようなアルキル基はまた、アリール、アルキルアリール、炭素環式アリール、複素アリール、アミドおよびエステル基を含むことができる。"アリール"基とは、共役したπ電子系を有する少なくとも1つの環を有する芳香族基を表し、炭素環式アリール、複素環式アリールおよびニテリール基が含まれる。これらはすべて任意に置換されているともよい。アリール基の好ましい置換基は、ハロゲン、トリハロメチル、ヒドロキシル、SH、OH、シアノ、アルコキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、およびアミノ基である。"アルキルアリール"基は、アリール基(上述)に共有結合したアルキル基(上述)を表す。炭素環式アリール基は、芳香族環の環原子がすべて炭素原子である基である。炭素原子は任意に置換されているともよい。複素環式アリール基は、芳香族環中の環原子として1-3個の複素原子を有し、環原子の残りが炭素原子である基である。適当な複素原子には、酸素、イオウ、および窒素が含まれ、例えば、フラニル、チエニル、ピリジル、ピロリル、N-低級アルキルピロロ、ピリミジル、ピラジニル、イミダゾリル等が挙げられる。これらはすべて任意に置換されているともよい。"アミド"とは、 $-C(O)-NH-R$ (式中、Rはアルキル、アリール、アルキルアリールまたは水素のいずれかである)を表す。"エステル"とは、 $-C(O)-OR'$ (式中、Rはアルキル、アリール、アルキルアリールまたは水素のいずれかである)を表す。

[0256]

本明細書において用いる場合、"ヌクレオチド"は、当該技術分野においては、天然塩基(標準的)、および当該技術分野においてよく知られる修飾塩基を含むと認識されている。そのような塩基は、一般にヌクレオチド構成成分の1'位に位置する。ヌクレオチドは一般に、塩基、糖およびリン酸基を含む。ヌクレオチドは、糖、リン酸および/または塩基成分において修飾されていてもされなくてもよい(互換的に、ヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、非標準的ヌクレオチド等とも称される。例えば、Usman and McSwiggen (上掲); Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; Usman et al., 国際公開WO93/15187; Uhlman and Peyman (上掲) (すべて本明細書の一部としてここに引用する)を参照)。当該技術分野において知られる修飾核酸塩基のいくつもの例があり、Limbach et al., 1994, *Nucleic Acids Res.* 22, 2183にまとめられている。核酸中に導入することができる塩基修飾のいくつもの非限定的例としては、例えば、イノシン、グリン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、シュードアラシド、2,4,6-トリメトキシベンゼン、3-メチルアラシド、ジヒドロウリジン、チラシル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン(例えば5-メチルシチジン)、5-アルキルウリジン(例えばリボチミジン)、5-ハロウリジン(例えば5-ブロモウリジン)または6-アザピリミジンまたは6-アルキルピリミジン(例えば6-メチルウリジン)、アロピジンおよびその他のものが挙げられる(Burgin et al., 1996, *Biochemistry*, 35, 14090; Uhlman and Peyman, 上掲)。この観点において、"修飾塩基"とは、1'位におけるアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシル以外のヌクレオチド塩基またはそれらの同等物を意味する。

[0257]

1つの態様においては、本発明はリン酸骨格修飾を有する修飾されたs i n A分子を特徴とし、これは1またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、モルホリノ、アミド、カルバメート、カルボキシメチル、アセトアミド、ボリアミド、ヌルホスネート、ヌルホスニート、ヌルホスニート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、および/またはアルキルシチル置換を含む。オリゴヌクレオチド骨格修飾の概説については、Hunziker and Le

umann, 1995, *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, Modern Synthetic Methods*, VCH, 331-417, およびMessmaeker et al., 1994, *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, 24-39を参照されたい。

[0258]

"塩基"とは、1'位において塩基を欠失しているか、または塩基の代わりに他の化学基を有する構成成分を意味する(例えば、Adamic et al., 米国特許5,998,203を参照)。

[0259]

"非修飾ヌクレオチド"とは、β-D-リボースの1'炭素に結合した塩基、アデニン、シトシン、グアニン、チミンまたはウラシルのいずれかの塩基を意味する。

[0260]

"修飾ヌクレオチド"とは、非修飾ヌクレオチドの塩基、糖および/またはリン酸の化学構造中に修飾を含む任意のヌクレオチド塩基を意味する。修飾ヌクレオチドの非限定的例は式I-VIIに示されるか、および/または本明細書に記載される他の修飾である。

[0261]

本発明において記載される2'-修飾ヌクレオチドに関して、"アミノ"とは、2'-NH<sub>2</sub>または2'-O-NH<sub>2</sub>を意味し、これは修飾されているとされなくてもよい。そのような修飾塩基は、例えば、Eckstein et al., 米国特許5,672,695およびMatulic-Adamic et al., 米国特許6,248,878(いずれもその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。

[0262]

核酸s i n A構造に対する種々の修飾を作成して、これらの分子の有用性を高めることができる。例えば、このような修飾は、製品寿命、インビトロの半減期、安定性、およびそのようなオリゴヌクレオチドを標的部位に導入する容易さを高め、例えば、細胞膜の透過性を高め、標的とする細胞を認識し結合する能力を付与するであろう。

[0263]

核酸分子の投与

本発明のs i n A分子は、単独で、または他の療法と組み合わせて、例えば、HIV感染に関連する病状またはAIDSの治療に用いるために適合させることができる。例えば、s i n A分子は、被験者に投与するためのリボソーム等のデリバリーベヒクル、担体および希釈剤、およびそれらの塩を含むことができ、および/または薬学的に許容しうる処方中に存在することができる。核酸分子のデリバリーの方法は、Akhtar et al., 1992, *Trends Cell Bio.*, 2, 139; Delivery Strategies for Antisense, *Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, 1995; Maurer et al., 1999, *Mol. Membr. Biol.*, 16, 129-140; Hoffmann and Huang, 1999, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 137, 165-192; およびLee et al., 2000, *ACS Symp. Ser.*, 752, 184-192(いずれも本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。Beigelman et al., 米国特許6,395,713およびSullivan et al., PCT WO94/025955は、さらに、核酸分子をデリバリーするための一般的な方法を記載する。これらのプロトコルを用いて、事実上いかなる核酸分子もデリバリーすることができる。核酸分子は、限定されないが、リボソームへの封入、イオントポレシス、または他のベヒクル、例えば、ヒドロゲル、シクロデキストリン(例えば、Gonzalez et al., 1999, *Bioconjugate Chem.*, 10, 1068-1074を参照)、生分解性ナノカプセル、および生体接着性

小球体への組み込み、または蛋白質性ベクター (O'Hare and Normand, 国際公開WO00/53722) によるものが含まれる。あるいは、核膜/ペリクルの組み合わせを、直接注入により、または注入ポンプを用いることにより局所的にデリバリーする。本発明の核膜分子の直接注入は、標準的な針とシリンジの方法論を用いて、または例えば Conry et al., 1999, *Cliva. Cancer Res.*, 5, 2330-2337 および Barry et al., 国際公開WO99/31262 に記載される無針手法により、皮下、筋肉内、または皮膚内に行うことができる。本発明の分子は医薬品として用いることができる。医薬品は、治療における疾病状態を予防し、発症を調節しまたは治療する (症状がある程度、好ましくは症状をすべて軽減する)。

10

【0264】 本発明は、本発明の1またはそれ以上の核膜を、許容しうる担体、例えば安定剤、緩衝液等を含む医薬組成物の特徴とする。本発明のポリスチレンオキドは、安定剤、緩衝液等を用いてまたは用いずに医薬組成物を形成することにより、任意の標準的な手段により、投与 (例えば、RNA, DNA または蛋白質) し、被験者に導入することができる。リポソームデリバリーメカニズムを利用することが望ましい場合には、リポソームを形成する標準的なプロトコルにしがうことができる。本発明の組成物はまた、経口投与用には錠剤、カプセルまたはエリキシールとして；直腸投与用には錠剤として；滅菌溶液として；注入投与の用には懸濁液として、および当該技術分野において知られる他の組成物として、処方し使用することができる。

20

【0265】

本発明はまた、記載される化合物の薬学的に許容しうる処方を含む。これらの処方には、上述の化合物の塩、例えば、酸付加塩 (例えば、塩酸、シュウ酸、酢酸およびペンソルホリン酸の塩) が含まれる。

【0266】

医薬組成物または処方は、細胞または被験者 (例えばヒト) への投与 (例えば全身投与) に適当な形態の組成物または処方を表す。適当な形態は、部分的には、使用する投与経路 (例えば経口、経皮、または注射) に依存する。そのような形態は、組成物または処方が標的細胞 (すなわち、真に荷電した核膜がデリバリーされる) が望まれる細胞) に到達することを妨害してはならない。例えば、血流中に注入される医薬組成物は可溶性でなければならぬ。他の因子は当該技術分野において知られており、例えば、毒性、および組成物または処方がその効果を発揮することを妨害する形態等を考慮することが含まれる。

30

【0267】

“全身投与”とは、インジボまでの全身吸収、または血流中における薬剤の蓄積の後に全身に分配されることを意味する。全身的吸收をもたず投与経路には、限定されないが、静脈内、皮下、腹腔内、吸入、経口、肺内および筋肉内に含まれる。これらの投与経路のそれぞれは、本発明の siRNA 分子をアッセイ可能な疾患組織に曝露する。薬剤が循環中に入る速度は、分子量またはサイエンスの関数であることが示されている。本発明の化合物を含むリポソームまたは他の薬剤担体を使用することにより、薬剤を、例えば、あるタイプのア組織 (例えば網状内皮系 (RES) の組織) に局在化させることが可能である。薬剤と細胞 (例えば白血球およびマクロファージ) の表面との会合を容易にすることができ、リポソーム処方または有用である。この方法は、マクロファージおよび白血球による異常な細胞 (例えば過剰の HIV を産生する細胞) の免疫認識の特異性を利用することにより、薬剤の標的細胞への輸送を増強するのである。

40

【0268】

“薬学的に許容しうる処方”とは、本発明の核膜分子をその所望の活性に最も適した物理学的に有効に分布させることができる組成物または処方意味する。本発明の核膜分子とともに処方するのに適した薬剤の非限定的例には以下のものが含まれる：CNS 中への薬剤の侵入を促進することができる P-糖蛋白質阻害剤 (Pluronic P-85 等

50

(Joliet-Riant and Tillement, 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 16-26)；大脳内移植後の徐放輸送用の生分解性ポリマー、例えばポリ (DL-ラクチド-ε-グリコリド) 微小球 (Emrich, Df et al., 1999, *Cell Transplant.*, 8, 47-58) (Alkermes, Inc. Cambridge, MA)；および薬剤を脳血管を越えて輸送することができ、神経の取り込みメカニズムを変更しうる、例えばポリプロピレン/アクリレートから作成される充填されたナノ粒子 (Porg Neurop sychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999)。本発明の核膜分子のデリバリー戦略の他の非限定的例には、Boad el al., 1998, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1308-1315; Tyler et al., 1999, *FEBS Lett.*, 421, 280-284; Pardridge et al., 1995, *PNAS USA*, 92, 5592-5596; Boado, 1995, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 15, 73-107; Aldrian-Herrada et al., 1998, *Nucleic Acids Res.*, 26, 4910-4916; および Tyler et al., 1999, *PNAS USA*, 96, 7053-7058 に記載される物質が含まれる。

10

【0269】

本発明はまた、ポリ (エチレングリコール) 脂質 (PEG-修飾、または長期間循環リポソームまたはスチレンリポソーム) を含む表面修飾リポソームを含む組成物の使用を特徴とする。これらの処方は、標的組織における薬剤の蓄積を増加させる方法を提供する。この種類の薬剤担体は、単核食細胞システム (MPS または RES) によるオプソニン作用および排除に抵抗性であり、したがって、封入された薬剤の血流循環時間を長くし、組織への露出を増強する (Lasic et al., *Chem. Rev.*, 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1995, 43, 1005-1011)。そのようなりポソームは、おそらくは脈管新生組織における流出および捕獲のため、腫瘍中に選択的に蓄積することが示されている (Lasic et al., *Science*, 1995, 267, 1275-1276; Ok et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90)。長期間循環リポソームは、特に、MPS の組織で蓄積することが知られている慣用のカチオン性リポソームと比べて、DNA および RNA の薬物動態学および薬力学を増強する (Liu et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, 42, 24864-24870; Choi et al., 国際公開WO96/10390; Holland et al., 国際公開WO96/10392)。長期間循環リポソームはまた、代謝的に攻撃的な MPS 組織、例えば肝臓および脾臓における蓄積を回避するその能力に基づいて、カチオン性リポソームと比較して薬剤をマクレーゼ分解からより強く保護するのである。

30

【0270】

本発明はまた、薬学的に有効な所望の化合物を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む、保存または投与用に調製される組成物を含む。治療用途に用いるための許容しうる担体または希釈剤は、医薬の技術分野においてよく知られており、例えば Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit., 1985) (本明細書の一部としてここに引用する) に記載されている。例えば、保存剤、安定剤、染料、および風味剤を用いることができる。これらには、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、および P-ヒドロキシ安息香酸のエステルが含まれる。さらに、抗酸化剤および懸濁剤を用いてもよい。

40

【0271】

薬学的に有効な用量とは、疾患状態の予防、発症の阻害、または治療 (症状がある程度

50



緩和し、好ましくはすべての症状を緩和する)に必要な用量である。薬学的に有効な用量は、疾患の種類、用いる組成物、投与の経路、治療する哺乳動物の種類、考慮中の特定の哺乳動物の物理学的特性、同時に投与される薬剤、および医薬の分野の当業者が認識するであろう他の因子によって異なる。一般に、負に荷電したポリマーの効力に依存して、 $0.1\text{ mg/kg} - 100\text{ mg/kg}$  体重/日の活性成分を投与する。

#### [0272]

本発明の核酸分子およびその処方は、慣用的な無毒性の薬学的に許容しうる担体、アジエバントおよびペプチクルを含む用量単位処方で、経口的に、局所的に、非経口的に、吸入またはアブレーションにより、または直腸に投与することができる。本明細書において、場合、非経口的との用語には、経皮、皮下、血管内(例えば、静脈内)、筋肉内、または腔腔内注射または注入の手法等が含まれる。さらに、本発明の核酸分子および薬学的に許容しうる担体を含む医薬処方が提供される。1またはそれ以上の本発明の核酸分子は、1またはそれ以上の無毒性の薬学的に許容しうる担体および/または希釈剤、および/またはアジエバント、および所望の場合には他の活性成分とともに存在することができる。本発明の核酸分子を含む医薬組成物は、経口使用に適した形、例えば、錠剤、トローチ剤、錠剤、水性または油性懸濁液、分散可能な粉体または顆粒、乳剤、微カプセルまたは軟カプセル、またはシロップまたはエリキシル剤の形であることができる。

#### [0273]

経口で使用する意図される組成物は、医薬組成物の製造について当該技術分野において知られる任意の方法にしたがって製造することができる。そのような組成物は、薬学的に洗練された口を含む製品を提供するために、1またはそれ以上のそのような甘味料、芳香剤、着色剤または保存剤を含んでもよい。錠剤は、錠剤の製造に適した無毒性の薬学的に許容しうる賦形剤との混合物として活性成分を含む。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム、顆粒化剤および崩壊剤、例えば、コーンスターチ、またはアルギン酸、結合剤、例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム、および潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクでありうる。錠剤は被覆しなくともよく、既知の手法により被覆してもよい。場合によっては、既知の手法によりそのような被覆を調製して、胃腸管における崩壊および吸収を遅延させ、このことによりより長い期間の持続的な作用を与えることができる。例えば、遅延用材料、例えばグリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートを用いることができる。

#### [0274]

経口使用のための処方は、活性成分が不活性固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリンと混合されている硬ゼラチンカプセル、または活性成分が水または油状媒体、例えば、ピーナツ油、液体パラフィンまたはオリーブ油と混合されている軟ゼラチンカプセルであってもよい。

#### [0275]

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適した賦形剤との混合物中に活性物質を含む。そのような賦形剤は、懸濁剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トララガントガムおよびアラビアゴムである。分散剤または懸濁剤は、天然に生ずるホフマン酸、例えば、レシチン、またはアルキルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪酸の縮合生成物、例えば、ヘキサデカエチレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンポリオールモノオレエート、またはエチレンオキシドと脂肪酸および無水ヘキサチオールから誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリエチレンビスヒタキシモノオレエートであったとしてもよい。水性懸濁液はまた、1またはそれ以上の保存剤、例えば、エチルアルコール、またはプロピルアルコール、またはヒドロキシベンゾエート、1またはそれ以上の着色剤、1またはそれ以上の芳香剤、および1またはそれ以上の甘味料、例

えばシロ糖またはサッカリンを含んでもよい。

#### [0276]

油性懸濁液は、活性成分を植物油、例えば、アラキス油、オリーブ油、ゴヤ油またはココナツ油、または無機油、例えば、液体パラフィン中に懸濁させることにより処方することができる。油性懸濁液は、増粘剤、例えば、ゼラチン、既パラフィンまたはセラルアルコールを含むことができる。甘味料および芳香剤を加えて、口を含む錠剤製品を得ることができる。これらの組成物は、抗酸化剤、例えばアスコルビン酸を加えることにより保存することができる。

#### [0277]

水を加えることにより水性懸濁液を製造するのに適した分散可能な粉体および顆粒は、活性成分を、分散剤または懸濁剤、懸濁剤および1またはそれ以上の保存剤との混合物中で与える。適当な分散剤または懸濁剤または顆粒は、上で例示したとおりである。さらに別の賦形剤、例えば、甘味料、芳香剤および着色剤が存在していてもよい。

#### [0278]

本発明の医薬組成物はまた、水中油エマルジョンの形であってもよい。油相は、植物油またはミネラルオイルまたはこれらの混合物であってもよい。適当な乳化剤としては、天然に生ずるガム、例えば、アラビアゴムまたはトラガントガム、天然に生ずるホスファチド類、例えば、大豆、レクチン、および脂肪酸とヘキサチオールから誘導されるエステルまたは部分エステル、無水物、例えば、ソルビタンモノオレエート、および前記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートが挙げられる。エマルジョンは、甘味料および芳香剤を含んでもよい。

#### [0279]

シロップおよびエリキシルは、甘味料、例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、グルコースまたはショ糖を用いて処方することができる。このような処方または、結着剤、保存剤および甘味料および着色料を含んでもよい。医薬組成物は、滅菌した注射可能な水性または油性の懸濁液の形でであってもよい。この懸濁液は、上述した適当な分散剤または懸濁剤を用いて、当該技術分野において知られるように処方することができる。滅菌した注射可能な製品はまた、無毒性の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒中の滅菌した注射可能な溶媒または懸濁液、例えば、1、3-ブタジエンモノール中の溶媒であってもよい。用いることのできる許容可能なペプチクルおよび溶媒の例は、水、リンゲル溶液および等張塩化ナトリウム溶液である。さらに、滅菌し固定した油を溶媒または懸濁媒体として便利に用いることができる。この目的のためには、任意の非刺激性の固定した油、例えば、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを用いることができる。さらに、脂肪酸、例えば、オレイン酸を注射可能な薬剤の製造において用いることができる。

#### [0280]

本発明の核酸分子はまた、例えば、薬剤の直腸投与用に、錠剤の形で投与することができる。これらの組成物は、薬剤を、通常の温度では固体であるが直腸温度では液体であり、したがって直腸中で溶融して薬剤を放出する適当な非刺激性賦形剤と混合することにより製造することができる。そのような材料としては、カカオバターおよびポリエチレングリコールが挙げられる。

#### [0281]

本発明の核酸分子は、滅菌媒体中で非経口的に投与することができる。薬剤は、使用するペプチクルおよび濃度に応じて、ペプチクル中に懸濁されていてもよく、溶解されていてもよい。アジエバント、例えば局所麻酔剤、保存剤および緩衝剤をペプチクル中に溶解することと有利である。

#### [0282]

上述した健康状態の治療には、体重1キログラムあたり1日あたり約0.1 mg - 約140 mgのオーダーの投与量レベルが有用である(治療者あたり1日あたり約0.5 mg - 約7 g)。担体物質と組み合わせる1回投与量を生産することとすることができる活性成分の量



例えば真核生物 Pol I, II または III の終止領域) ; および c) 本発明の sRNA 分子の少なくとも 1 つをコードする核酸配列を含み、前記配列は、sRNA 分子の発現および/またはデリバリーを可能とする様式で、前記開始領域および前記終止領域に動作可能なように連結されている。ベクターは、任意に、本発明の sRNA をコードする配列の 5' 側または 3' 側に動作可能なように連結された近白質のオーグメンティングプライム (ORF) ; および/またはイントロン (介在配列) を含んでいてもよい。

[0291]

sRNA 分子配列の転写は、真核生物 RNA ポリメラーゼ I (Pol I), RNA ポリメラーゼ II (Pol II), または RNA ポリメラーゼ III (Pol III) のプロモーターにより推進させることができる。Pol I または Pol II のプロモーターからの転写産物は、すべての細胞において高いレベルで発現される。あるタイプの細胞におけるある Pol I プロモーターのレベルは、近くに存在する遺伝子制御配列 (エンハンサー、サイレンサー等) の性質に依存する。真核生物 RNA ポリメラーゼ酵素が適当な細胞中で発現される限り、真核生物 RNA ポリメラーゼプロモーターもまた用いられる (Elroy-Stein and Moss, 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6743-7; Gao and Huang, 1993 Nucleic Acids Res., 21, 2867-72; Lieber et al., 1993 Methods Enzymol., 217, 47-66; Zhou et al., 1990 Mol. Cell. Biol., 10, 4529-37)。何人かの研究者が、そのようなプロモーターから発現した核酸分子が哺乳動物細胞中で機能しうることを示している (例えば、Kashani-Sabet et al., 1992 Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Ojwang et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992 Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Yu et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6340-4; L'Huillier et al., 1992 FMO J. 11, 4411-8; Liszewicz et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 8000-4; Thompson et al., 1995 Nucleic Acids Res., 23, 2259; Sullenger & Czech, 1993, Science, 262, 1566)。より詳細には、転写ユニット、例えば U6 小核 (snRNA)、転移 RNA (tRNA) および アデノウイルス VA RNA をコードする遺伝子に由来するものは、細胞中において高濃度の所望の RNA 分子 (例えば sRNA) を生成するのに有用である (Thompson et al., (上掲) ; Couture and Stinchcomb, 1996, (上掲) ; Noonerberg et al., 1994, Nucleic Acid Res., 22, 2830; Noonerberg et al., 米国特許 5,1624,803; Good et al., 1997, Gene Ther., 4, 45; Belcicreiman et al., 国際公開 WO 96/18736)。

上述の sRNA 転写ユニットは、哺乳動物細胞中に導入するために種々のベクター中に組み込むことができる。ベクターとしては、限定されないが、プラスミド DNA ベクター、ウイルス DNA ベクター (例えば アデノウイルスまたは アデノ随伴ウイルスベクター)、または ウイルス RNA ベクター (例えば レトロウイルスまたは アルファウイルスベクター) が挙げられる (総説については、Couture and Stinchcomb, 1996, (上掲) を参照)。

[0292]

別の観点においては、本発明の sRNA 分子の少なくとも 1 つをコードする核酸配列を、その sRNA 分子の発現を可能とする様式で含む発現ベクターを特徴とする。1 つの態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域 ; b) 転写終止領域 ; および c) sRNA 分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み ; この配列は、sRNA 分子の発現および/またはデリバリーを可能とする様式で、開始領域および終止領

域に動作可能なように連結されている。

[0293]

別の態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域 ; b) 転写終止領域 ; c) オーグメンティングプライム ; および d) sRNA 分子の少なくとも 1 つの鎖をコードする核酸配列を含み、この配列は、オーグメンティングプライムの 3' 末端に動作可能なように連結されており、配列は、sRNA 分子の発現および/またはデリバリーを可能とする様式で、開始領域、オーグメンティングプライムおよび終止領域に動作可能なように連結されている。さらに別の態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域 ; b) 転写終止領域 ; c) イントロン ; および d) 少なくとも 1 つの sRNA 分子をコードする核酸配列を含み ; この配列は、核酸分子の発現および/またはデリバリーを可能とする様式で、開始領域、イントロンおよび終止領域に動作可能なように連結されている。

[0294]

別の態様においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域 ; b) 転写終止領域 ; c) イントロン ; d) オーグメンティングプライム ; および e) sRNA 分子の少なくとも 1 つの鎖をコードする核酸配列を含み、この配列は、オーグメンティングプライムの 3' 末端に動作可能なように連結されており、配列は、sRNA 分子の発現および/またはデリバリーを可能とする様式で、開始領域、イントロン、オーグメンティングプライムおよび終止領域に動作可能なように連結されている。

[0295]

HIV の懸念

AIDS (後天性免疫不全症候群) は、1981 年に米国で最初に報告され、それ以来、主要な世界的流行病となった。AIDS は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) により引き起こされる。HIV は身体の免疫系の細胞を殺すか傷害を与えることにより、感染およびある種の痛と闘う身体的能力を進行的に破壊する。AIDS と診断された人々は、通常は健康な人々と病気にしない微生物、例えば ウイルス または 細菌 により引き起こされる。日和見感染と称される生命を脅かす病にかかりうる。1981 年以来、米国では 790,000 以上の AIDS の症例が報告されており、900,000 人ものアメリカ人が HIV に感染している。

[0296]

HIV 感染により、慢性的進行性の病気になる。その経過はウイルス複製のレベルの増加およびより有害なウイルス株の出現により示される。このプロセスは免疫系の破壊を引き起こす。HIV 感染は、CD4 細胞数および臨床症状により段階が区別される。すべての人がすべての段階を経て進行するわけではなく、また時間経過も人によって非常に異なる。HIV に感染した後、通常はセロコンバージョン疾患が生じ、次に無症候性期があり、これは数ヶ月から数年続く (18 年まで、ただし平均は 10 年である)。この後に症候性期となり、これは進行性免疫不全と相關する。HIV 感染の進行は人により様々であり、血漿中のウイルス量を測定し、進行の速度を推定するのに重要な代理マーカーである。これは RNA コピー/ml で測定される。また、これを用いて、薬剤療法に対する応答を評価し、薬剤耐性の発達を予測することができる。セロコンバージョンの後、それぞれの人はウイルス負荷量の設定値を発生させる。ウイルス負荷量が低いほど、HIV 疾病 (すなわち免疫系の破壊) は最終的な臨床症状および日和見状態の進行は遅い。HIV に感染した人々の 50-90% は慢性的な臨床疾患を有し、これは典型的には HIV の感染性曝露の 2-4 週間後に生ずる。症状は非特異的 (ウイルスまたはインフルエンザ様) でありうるため、しばしばこれらのセロコンバージョン疾患は回流的に認識される。多くの者は単細胞症候群を発症し、これは急性的に始まり、2 週間まで続く。症状には、熱、頭痛、リンパ節腫、筋肉痛、発疹、および粘膜皮膚潰瘍化が含まれる。実験室で試験すればウイルス感染を示すかもしれない。この時点で、HIV に対する抗体はまだ形成されていなくとも、HIV p24 抗原は検出されうる。この時点ではウイルス負荷量は非常に高く、セロコンバージョンの間に、CD4 数は過渡的に低下する。

【0297】  
HIVはレンチウイルスファミリーのレトロウイルスメンバーである。レトロウイルスはエンベロープを有するRNAウイルスであり、逆転写酵素と称されるRNA依存性DNAポリメラーゼを有することと特徴とする。2つのタイプのウイルスがヒトに影響を与えることが知られている。HIV-1はAIDSを引き起こし、世界中で見いだされる。HIV-2はアフリカ人のAIDSの症例において単離されている。

【0298】  
ウイルスは、細胞外における形として、直径約100nmの脂質に被覆された円筒形のヌクレオカプシドとして存在する。その脂質エンベロープ中に糖蛋白質が挿入されており、その一部(糖蛋白質 [gp] 120)は、宿主細胞(T-リンパ球ヘルパー細胞、活性化単球およびマクロファージ、およびグリア細胞)のCD4レセプターに結合する結合領域を形成する。ウイルスは、細胞膜と融合し、細胞質内に入った後、そのエンベロープを失い、RNAのDNAへの逆転写が生ずる。

【0299】  
ウイルスDNAは、ウイルスのエンベロープにより、宿主細胞DNA中に潜伏性プロウイルスとしてインテグレートされる。宿主細胞が遺伝的に感染していれば、感染は発症しない。宿主が活動的に感染していれば、プロウイルスDNAが転写され、翻訳され、ウイルス蛋白質およびRNAが産生される。ウイルス蛋白質は集合し、宿主細胞の脂質膜を通して新たなビリオンとして発芽する(リバースエンブライメント)。ウイルスは発芽または細胞から細胞への移動により播種される。

【0300】  
HIV発病の重症度が進行するにつれて、免疫系のすべての成分の異常が見られる。HIV感染の最も重要な結果は細胞媒介性(T細胞)免疫の傷害である。HIVはTヘルパー細胞のCD4レセプターに直接結合し、そのためこのT細胞集団が進行的に耗竭する。その結果、免疫系は次の能力が低下する:(1)ウイルスに感染した細胞または癌に対する細胞毒性T細胞応答を高める、(2)遅延型過敏性反応を形成する、および(3)新たな外来物質を加工して免疫系に提示する。HIVに感染したほとんどの人では、免疫性免疫の著しい障害が生ずる。HIVは単球およびマクロファージにも感染しうる。

【0301】  
したがって、HIV遺伝子を標的とする小干渉核酸分子の使用は、HIV感染およびAIDS、ならびに免疫学的疾患またはHIV遺伝子の調節に応答する他の任意の疾病または病気を治療するために用いることができる一群の新規治療剤を提供する。

【実施例1】  
【0302】  
以下は本発明の核酸の選択、単離、合成および活性を示す非限定的例である。  
【0303】

#### 実施例1: sINACONストラクトのタンデム合成

本発明の例示的sINACON分子は、切断可能なリンカー、例えば、ヌクレオチドリンカーを用いて、タンデムで合成する。本明細書に記載されるタンデム合成の後、1段階精製プロセスを行って、RNA分子を高収率で得る。この方法はハイスループアウトRNAiスクリーニングを変えるsINACON合成に非常に適しており、マルチカラムまたはマルチエルの合成プラットフォームに容易に適合させることができる。

【0304】  
5'末端ジメトキシトリチル(5'-O-DMT)基がそのまま残るsINACONおよびその相補鎖のタンデム合成(トリチルオン合成)が完了した後、オリゴヌクレオチドを上記のようにして脱保護する。脱保護の後、sINACON配列鎖を自発的にハイブリダイズさせる。このハイブリダイゼーションにより、一方の鎖が5'-O-DMT基を保持し、相補鎖が末端5'-ヒドロキシルを含むデュエプレックスが得られる。新たに形成されたデュエプレックスは、1つの分子のみがジメトキシトリチル基を有するにもかかわらず、日常的な面相抽出精製(トリチルオン精製)の間、単一の分子として振る舞う。これらの

鎖は安定なデュエプレックスを形成するため、オリゴの対を例えばC18カートリッジを用いて精製するためには、このジメトキシトリチル基(または同等の基、例えば他のトリチル基または他の疎水性成分)のみが必要である。

【0305】  
タンデムリンカー、例えば反転デオキシ無塩基ヌクレオチドまたはグリセリルヌクレオチドリンカー(図1を参照)または同等の切断可能なリンカーを導入する時点までは、標準的なホスホルアミダイト合成化学を用いる。用いることができるリンカー結合条件の非限定的例には、活性化剤、例えばフロモトリビロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸(PYBROP)の存在下で、妨害塩基、例えばジイソプロピルエチルアルミン(DIPEA)および/またはDMAPを使用することが含まれる。リンカーを結合させた後、標準的な合成化学を用いて第2の配列の合成を完了し、末端の5'-O-DMT基がそのまま残る。合成後、得られたオリゴヌクレオチドを本明細書に記載される方法にしたがって脱保護し、適当な緩衝液、例えば、50mM NaOAcまたは1.5M NH<sub>4</sub>Cl, 10% C<sub>2</sub>O<sub>3</sub>で反応を停止させる。

【0306】  
sINACONデュエプレックスの精製は、固相抽出、例えば、1カラム容量(CV)のアセトニトリル、2CVのH<sub>2</sub>O、および2CVの50mM NaOAcで調整したWater C18 Sep Pak 1gカートリッジを用いて、容易に行うことができる。サンプルを負荷し、1CVのH<sub>2</sub>Oまたは50mM NaOAcで洗浄する。失敗配列は1CVの14% ACN(水性; 50mM NaOAcおよび50mM NaClを含む)で溶出する。次にカラムを1CVのH<sub>2</sub>O等で洗浄し、例えば、1CVの1%水性トリフルオロ酢酸(TFA)をカラムに通し、次にさらに1CVの1%水性TFAをカラムに加えて約10分間放置することにより、カラム上で吸トリチル化を行う。残りのTFA溶液を除去し、カラムをH<sub>2</sub>Oで、次に1CVの10mM NaClおよび前述のH<sub>2</sub>Oで洗浄する。次に、sINACONデュエプレックス生成物を、例えば、1CVの20%水性CANを用いて溶出する。

【0307】  
図2は、精製したsINACONストラクトのMALDI-TOF質量分析の例を示し、ここで、各ピークはsINACONデュエプレックスの個々のsINACON鎖の計算質量に対応する。同じ精製sINACONは、キヤピラリー電気泳動(CGE)で分析したときに3つのピークを与える。1つのピークはおそらくデュエプレックスsINACONに対応し、2つのピークはおそらく個々のsINACON配列鎖に対応する。同じsINACONストラクトのイオン交換HPLC分析では単一のピークしか示されない。以下に記載されるルジノエーゼンポーターアッセイを用いる精製sINACONストラクトの試験は、別々に合成したオリゴヌクレオチド配列鎖から生成したsINACONストラクトと比較して、RNAi活性が同じであることを示した。

#### 実施例2: 任意のRNA配列中の潜在的sINACON標的部位の同定

目的とするRNA標的、例えばウイルスまたはヒトmRNA転写産物の配列を、例えばコンピュータプログラムアルゴリズムを用いることにより、標的部位についてスクリーニングする。非限定的例においては、Genbank等のデータベースから得られる遺伝子またはRNA遺伝子転写産物の配列を用いて、標的に対して相補性を有するsINACON標的を生成する。そのような配列は、データベースから得ることができるか、または当該技術分野において知られるように実験的に決定することができる。既知の標的部位、例えば、リボザイムまたはアンチセンス等の他の核酸分子を用いた研究に基づいて有効な標的部位であると決定されている標的部位、または疾病または健康状態に関連していることが知られている標的、例えば変異または欠失を含む部位を用いて、これらの部位を標的とするsINACON分子を設計することができる。個々のパラメータを用いて、標的RNA配列中でいすれの部位が最も適当な標的部位であるかを判定することができる。これらのパラメータには、限定されないが、二次または三次RNA構造、標的配列のヌクレオチド塩基

組成、標的配列の種々の領域間のホモロジーの程度、またはRNA転写産物中の標的配列の相対的位置が含まれる。これらの判定に基づいて、RNA転写産物中の任意の数の標的部位を選択して、例えば、インビトロRNA切断アッセイ、培養細胞、または動物モデルを用いることにより、効力についてsRNA分子をスクリーニングすることができる。非限定的例においては、用いるべきsRNAコンストラクトのサイズに基づいて、転写産物中のいずれかの位置の1-1000個の標的部位を選択する。当該技術分野において知られる方法、例えば標的遺伝子発現の有効な減少を判定するアルテラールまたはアルテラールアッセイを用いて、sRNA分子をスクリーニングするためのハイスループットスクリーニングアッセイを開発することができる。

[0309]

### 実施例3：RNA中のsRNA分子標的部位の選択

以下の非限定的工程を用いて、所定の遺伝子配列または転写産物を標的とするsRNAの選択を行うことができる。

[0310]

1. 標的配列をインシリコで解析して、標的配列中に含まれる特定の長さのすべてのフラグメントまたはサブ配列、例えば23ヌクレオチドフラグメントのリストを作成する。この工程は、典型的にはあつたPerilスクリプトを用いて行うが、市販の配列分析プログラム、例えば、Oligo、MacVector、またはthe GCG Wisconsin Packageも同様に用いることができる。

[0311]

2. 場合によっては、sRNAは2以上の標的配列に対応する。これは、例えば、同じ遺伝子の異なる転写産物を標的とする場合、2以上の遺伝子の異なる転写産物を標的とする場合、またはヒト遺伝子と動物ホモログとの両方を標的とする場合に生じうる。この場合には、それぞれの標的について特定の長さのサブ配列のリストを生成し、次にリストを比較して、各リスト中でマッチング配列を見いだす。次に、サブ配列を、所定のサブ配列を含む標的配列の数にしたがってランク付けする。この目的は、標的配列のほとんどまたはすべてに存在するサブ配列を見いだすことである。あるいは、ランク付けにより、標的配列にユニークなサブ配列、例えば変異体標的配列を同定することができ、このような方法により、変異体配列を特異的に標的とし、正常な配列の発現に影響を及ぼさないsRNAの使用が可能となるであろう。

[0312]

3. 場合によっては、sRNAのサブ配列は、1またはそれ以上の配列中には存在しないが、所望の標的配列中に存在する。これは、sRNAが標的とされないままであるべきパラログスファミリーのメンバーを有する遺伝子を標的とする場合に生じうる。上述のクース2におけるように、それぞれの標的について特定の長さのサブ配列のリストを生成し、次にリストを比較して、標的遺伝子中に存在するが標的ではないパラログ中には存在しない配列を見いだす。

[0313]

4. ランク付けされたsRNAサブ配列をさらに分析して、GC含量にしたがってランク付けすることができる。30-70%のGCを含有する部位が好ましく、40-60%のGCを含有する部位がさらに好ましい。

[0314]

5. ランク付けされたsRNAサブ配列をさらに分析して、自己フォールディングおよび内部ヘアピンにしたがってランク付けすることができる。内部フォールディングがより強いことが好ましい。強いヘアピン構造は回避すべきである。

[0315]

6. ランク付けされたsRNAサブ配列をさらに分析して、配列中にGC GまたはCC Cの連続を有するか否かにしたがってランク付けすることができる。いずれかの類にGC G（またはさらに多いG）が存在すると、オリゴヌクレオチド合成に問題が生じることがあり、RNA活性を妨害する可能性がある。したがって、よりよい配列が利用可能であ

る限り、これは回避する。CCCはアンチセンス鎖にGGGを配置するため、標的鎖中で検索する。

[0316]

7. ランク付けされたsRNAサブ配列をさらに分析して、配列の3'末端にジュアレオチドUU（ウリジンジュアレオチド）を、および/または配列の5'末端にAA（アンチセンス配列に3' UUを生ずる）を有するか否かにしたがってランク付けする。これらの配列により、末端TTチミンジュアレオチドを有するsRNA分子を設計することが可能となる。

[0317]

8. 上述のようにランク付けされたサブ配列のリストから4個または5個の標的部位を選択する。次に、例えば、23ヌクレオチドを有するサブ配列において、それぞれの選択された23-merサブ配列の右側21ヌクレオチドをsRNAデュープレックスの上側（センス）鎖用に設計し合成し、一方、それぞれの選択された23-merサブ配列の左側21ヌクレオチドの逆相補鎖をsRNAデュープレックスの下側（アンチセンス）鎖用に設計し合成する（表11および111を参照）。末端TT残基が配列にとつて望ましい場合には（パラグラフ7に記載するように）、オリゴを合成する前にセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方の2つの3'末端ヌクレオチドをTTで置き換える。

[0318]

9. sRNA分子をインビトロ、培養細胞または動物モデル系においてスクリーニングして、最も活性なsRNA分子、または標的RNA配列中の最も好ましい標的部位を同定する。

[0319]

別の方法においては、HIV標的配列に特異的なsRNAコンストラクトのグループを用いて、HIV RNAを発現する細胞、例えば、B細胞、T細胞、マクロファージおよび内皮細胞培養系において、標的部位についてスクリーニングする。この方法において用いられる一般的な戦略は図9に示される。そのようなグループの非限定的例は、それぞれ、配列番号1-738、1477-1490、1499-1506、1515-1522、1531-1534、1539-1546、1555-1556、1559-1566、および1575-1576を含むセンス配列、および配列番号739-1476、1491-1498、1507-1514、1523-1530、1535-1538、1547-1554、1557-1558、および1567-1574を含むアンチセンス配列を有する配列を含むグループである。HIVを発現する細胞（例えばA549またはCaCo-2細胞）をsRNAコンストラクトのグループでトランスフェクトし、HIVの阻害に伴う表現型を示す細胞を分類する。sRNAコンストラクトのグループは、適当なベクター中に挿入された細胞カセットから発現させることができる（例えば、図7および図8を参照）。ポジティブの表現型変化（例えば、増殖の低下、HIV mRNAレベルの低下またはHIV蛋白発現の低下）を示す細胞からのsRNAをシーケンスして、標的HIV RNA配列中の最も適当な標的部位を決定する。

[0320]

### 実施例4：HIVを標的とするsRNAの設計

sRNAの標的部位は、実施例3に記載されるsRNA分子のライブラリを用いて、あるいは本明細書の実施例6に記載されるようなインビトロsRNAシステムを用いて、HIV RNA標的の配列を分析し、任意にフォールディング（sRNAの標的へのアクセス可能性を判定するために分析される任意の所与の配列の構造）に基づいて標的部位に優先順位を付けることにより、選択した。HIV-1 RNA標的の配列（例えば、表11に示されるGenbank受託番号）を分析し、任意にフォールディング（sRNAの標的へのアクセス可能性を判定するために分析される任意の所与の配列の構造）に基づいて標的部位に優先順位を付けることにより、sRNA標的の部位を選択した。A株およびB株が現在最も優勢な株であるため、HIVのすべての既知のAおよびB株の配列アラインメントをホモロジーについてスクリーニングし、これらの株に共通する保存配列を標的と



するよう s i n A 分子を設計した。あるいは、すべての既知の株または他のサブクラスの H I V を同様にホモロジについてヌクレオニシグとして (表 I V を参照)、相同な配列を標的として用いることができる。異なる株の間の % ホモロジを用いて、考慮すべき 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % または 95 % ホモロジを用いて、考慮すべき標的の数を増加または減少させることができる。表 I に示される配列は、表 I I I に示される H I V 株の間の 80 % ホモロジを表す。それぞれの標的配列に結合しうよう s i n A 分子を設計し、任意にコンプレックスを形成する。s i n A 分子の長さを種々に変化するようにより、活性を最適化することができる。表 I に示される s i n A センズ配列 (上側配列) および アンチセンス配列 (下側配列) は、19ヌクレオチドの長さを含み、センス鎖は標的配列と同じ配列を含み、アンチセンス鎖はセンス鎖の長さを含み、配列を含む。センスおよびアンチセンス鎖はさらに、本明細書に記載されるように、ヌクレオチド 3'-オーバーハングを含むことができ、好ましくは、オーバーハングは約 2ヌクレオチドを含む。これは任意に、アンチセンス s i n A 鎖中の標的配列に相補的であってもよく、および/またはセンス s i n A 鎖中に存在する場合に任意に標的配列中の隣接するヌクレオチドに類似していてもよい。一般に、標的 RNA と結合する長さもなくばこれと相互作用する十分な数の相補的ヌクレオチド塩基が選択されるが、種々の長さまたは塩基組成の s i n A デュプレックスに適応させるようにより、相補性の程度を調節することができ。そのような方法論を用いることにより、s i n A 分子は、任意の既知の RNA 配列、例えば、任意の遺伝子転写産物に対応する RNA 配列中の部位を標的とするよう設計することができる。

### 【0321】

化学的に修飾された s i n A コンストラクトを設計して、RNAi 活性を媒介する能力を保持しながら、インビボでの全身投与のためのヌクレアーゼ安定性および/または改良された薬物動態学、局在化、およびテリバリ-特性を提供することができる。本明細書に記載される合成方法および一般に当該技術分野において知られる合成方法を用いて、本明細書に記載される化学修飾を合成的に導入する。次に、血清および/または細胞/組織抽出物 (例えば肝臓抽出物) 中で、合成 s i n A コンストラクトをヌクレアーゼ安定性についてアッセイする。合成 s i n A コンストラクトはまた、適当なアッセイ、例えば本明細書に記載されるルシフェラーゼレポートシステムまたは RNAi 活性を定量化する他の適当なアッセイを用いて、RNAi 活性についても平行して試験する。ヌクレアーゼ安定性および RNAi 活性の両方を有する合成 s i n A コンストラクトは、さらに改良して安定性および活性のアッセイにおいて再評価することができる。次に、任意の選択された RNA を標的とするいずれかの s i n A 配列に安定化活性 s i n A コンストラクトの化学的修飾を適用して、例えば、標的ヌクレオニシグアッセイにおいて用いて、治療を開発するための s i n A 化合物のリードを拾い上げることができる (例えば、図 11 を参照)。

### 【0322】

#### 実施例 5: s i n A の化学合成および精製

s i n A 分子は、RNAi マッセンジ中の種々の部位、例えば、本明細書に記載される RNA 配列中の標的配列と相互作用するよう設計することができる。s i n A 分子の一方の鎖の配列は、上述した標的配列に相補的である。s i n A 分子は、本明細書に記載される方法を用いて化学的に合成することができる。対照配列として用いられる不活性 s i n A 分子は、s i n A 分子の配列を標的配列に相補的ではないように入ララング化するることにより、合成することができる。一般に、s i n A コンストラクトは、本明細書に記載するように、面相オリゴヌクレオチド合成方法を用いて合成することができる (例えば、Usman et al., 米国特許 5,804,683;5,831,071;5,998,203;6,117,657;6,353,098;6,362,323;6,437,117;6,469,158;Scarlinge et al., 米国特許 6,111,086;6,008,400;6,111,086 を参照 (いずれもその全体

を本明細書の一部としてここに引用する)。

### 【0323】

非限定的例においては、RNAi オリゴヌクレオチドは、当該技術分野において知られるように、ホスホルアミダイト化学を用いて段階的様式で合成する。標準的なホスホルアミダイト化学においては、5'-O-ジメトキシトリチル、2'-O-tert-ブチルジメチルシリル、3'-O-2'-アノエチル N,N'-ジイソプロピルホスホルアミダイト基、および環外アミン保護基 (例えば、N6-ベンゾイルアデノシン、N4-アセチルシチジン、および N2-イソブチルグアノシン) により記載されるように、RNA の合成において 2'-O-シリルエーテルを被不安定性 2'-O-アルトエーテル保護基と組み合わせて用いてもよい。異なる 2' 化学は異なる保護基を必要とし、例えば、Usman et al., 米国特許 5,631,360 (その全体を本明細書の一部としてここに引用する) に記載されるように、2'-デオキシ-2'-アミノヌクレオチドには N-フタロイル保護を用いることができる。

### 【0324】

面相合成の間に、各ヌクレオチドを順番に (3'-から 5'-方向に) 固相支持体結合オリゴヌクレオチドに付加する。鎖の 3' 末端の最初のヌクレオチドを種々のリンカーを用いて固相支持体 (例えば、調整多孔ガラスまたはポリスチレン) に共有結合させる。ヌクレオチド前駆体、リボヌクレオシドホスホルアミダイト、および活性化剤を混合して、第 1 のヌクレオシドの 5' 末端上に第 2 のヌクレオシドホスホルアミダイトをカップリングさせる。次に支持体を洗浄し、未反応 5'-ヒドロキシ基を無水酢酸等のキヤッピング試薬を用いてキヤッピングして、不活性な 5'-アセチル成分を得る。次に 3 面リン結合を酸化してより安定なリン酸結合とする。ヌクレオチド付加サイクルの最後に、適当な条件下で (例えば、トリチル系の基については酸性条件、シリル系の基についてはフッ化物を用いて)、5'-O-保護基を切断する。それぞれの次のヌクレオチドについてこのサイクルを繰り返す。

### 【0325】

合成条件を改変して、例えば、合成すべき s i n A の特定の化学組成に応じて、異なるカップリング時間、異なる試薬/ホスホルアミダイト濃度、異なる接触時間、異なる固相支持体および固相支持体リンカー化学を用いることにより、カップリング効率を最適化することができる。s i n A の脱保護および精製は、一般に記載されているようにして行うことができる (Usman et al., 米国特許 5,831,071, 米国特許 6,353,098, 米国特許 6,437,117, および Bellion et al., 米国特許 6,054,576, 米国特許 6,162,909, 米国特許 6,303,773 (その全体を本明細書の一部としてここに引用する)、または Scarlinge (上掲))。さらに、脱保護条件を改変して、可能な限り最高の収量および純度の s i n A コンストラクトを得る。例えば、本出願人は、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは、水性メチルアミンを用いて約 35℃ で 30 分間脱保護する。そのように、2'-デオキシ-2'-フルオロ含有オリゴヌクレオチドがリボヌクレオチドを含む場合には、水性メチルアミンで約 35℃ で 30 分間脱保護した後、TEA-HF を加え、反応液をさらに 15 分間約 65℃ に維持する。

### 【0326】

#### 実施例 6: s i n A 活性を評価するための RNAi インビトロアッセイ

RNAi を無細胞システムにおいて再現するインビトロアッセイを用いて、HIV RNAi 標的を標的とする s i n A コンストラクトを評価する。アッセイは、Tuschli (1999, Genes and Development, 13, 3191-3197) および Zamora (2000, Cell, 101, 25-33) に記載され、HIV 標的の RNAi に適合させた系を含む。シグナル伝達経路に由来するシグナルトランスミターを用いてインビトロで RNAi 活性を再構築する。標的 RNA は、HIV を発現す



る適当なガラスミドからT7 RNAポリメラゼを用いてインビトロ転写することにより、または本明細書に記載されるように化学合成により作製する。センスおよびアンチセンス sRNA (例えば各20 μM) は、緩衝液 (例えば、100 mM 酢酸カリウム、30 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 2 mM 酢酸マグネシウム) 中で90℃で1分間、次に37℃で1時間インキュベーションすることによりアンニリングさせ、次に溶解緩衝液 (例えば100 mM 酢酸カリウム、30 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 2 mM 酢酸マグネシウム) で希釈する。アンニリングは、アポロースゲルを用いてTBE緩衝液でゲル電気泳動し、臭化エチジウムで染出することによりモニタリングすることができる。シオウジョウバエの溶解物は、緑毛膜を除き溶解する。溶解物を遠心分離し、上清を単離する。アッセイは、50% 溶解物 [vol/vol], RNA (10-50 pM の最終濃度)、および sRNA (10 nM の最終濃度) を含む 10% [vol/vol] 溶解緩衝液を含有する反応混合物を含む。反応混合物はまた、10 mM のクレアチニン酸、10 μg/ml のクレアチンホスホキナーゼ、100 μM のGTP、100 μM のUTP、100 μM のCTP、500 μM のATP、5 mM のDTT、0.1 U/μL のRNasin (Promega)、および100 μM の各アミノ酸を含む。酢酸カリウムの最終濃度は100 mM に調節する。反応は氷上で予め組立て、25℃で10分間インキュベーションした後、RNA を加え、25℃でさらに60分間インキュベーションする。4倍容量の1.25x Passive Lysis Buffer (Promega) で反応を停止させる。標的RNAの切断は、RT-PCR分析または当該技術分野において知られる他の方法によりアッセイし、反応からsRNAが省略されている対照反応と比較する。

[0327]

あるいは、アッセイ用の内部標識した標的RNAを [アルファ-<sup>32</sup>P] CTP の存在下でインビトロ転写により調製し、ヌクレオチドグラフィーによりG50セプテックスカラムを通し、さらに精製することなく標的RNAとして用いる。任意に、標的RNAはT4ポリヌクレオチドキナーゼ酵素を用いて5'-<sup>32</sup>P末端標識してもよい。アッセイは上述のようにして行い、標的RNAおよびRNAiにより生成する特異的RNA切断産物をゲルのオートラジオグラフィで可視化する。切断のパーセントは、無標の対照RNAまたはsRNAなしの対照反応からのRNA、およびアッセイにより生成する切断産物を表すバンドをPhosphorImager (登録商標) で定量することにより決定する。

[0328]

1つの態様においては、このアッセイを用いて、sRNA媒介性RNAi切断のためのHIV RNA標的の標的部位を決定する。すなわち、例えば、標識した標的RNAの電気泳動によりアッセイ反応を分析することにより、またはノザンプロットにより、ならびに当該技術分野において知られる他の方法論により、複数のsRNAコンストラクトをHIV RNA標的のRNAi媒介性切断についてスクリーニングする。

[0329]

実施例7: HIV標的RNAのインビトロの核糖阻害

上述したようにして、ヒトHIV RNAを標的とするsRNA分子を設計し、合成する。これらの核酸分子は、例えば以下の方法を用いることにより、インビトロで切断活性について試験することができ。HIV RNA中の標的配列およびヌクレオチドの位置を表11および111に示される。

[0330]

2つのアッセイを用いて、HIVを標的とするsRNAの効力を試験する。第1に、例えば、B細胞、T細胞、マクロファージまたは内皮細胞培養系を用いて、細胞培養において試験を試験して、RNAおよび蛋白質の阻害の程度を決定する。本明細書に記載されるように、HIV標的に対するsRNA試験 (例えば、表11および111を参照) を選択する。これらの試験を適当なトランスフェクション試験により、例えば、B細胞、T細胞、マクロファージまたは内皮細胞にデリバリーした後、RNA阻害を測定する。増幅

のリアルタイムPCRモニタリング (例えば、ABI 7700 Taqman (登録商標) を用いて、アクチンに対する標的RNAの相対量を測定する。無関係の標的に対して、または同じ全体の長さおよび化学を有するがそれらの位置でランダムに置換されているランダム化sRNA対照に対して作製したオリゴヌクレオチド配列の混合物と比較する。標的に対して一次および二次のリード塩を選択し、最適化を行う。最適なトランスフェクション試験濃度を選択した後、リードsRNA分子を用いてRNAの阻害の即時変化を測定する。さらに、細胞-ブリーチングアッセイを用いてRNA阻害を決定することができる。

[0331]

sRNAの細胞へのデリバリー

細胞 (例えば、B細胞、T細胞、マクロファージまたは内皮細胞) は、トランスフェクションの前日に、例えば、EGM-2 (BioWhittaker) 中で1x10<sup>6</sup>細胞/ウエルで6-ウエルディッシュに播種する。sRNA (例えば最終濃度20 nM) およびカチオン性脂質 (例えば最終濃度2 μg/ml) を、ポリスチレン管でEGM基礎培地 (BioWhittaker) 中で、37℃で30分間複合体化させる。ボルテックスした後、複合体化したsRNAを各ウエルに加え、示される時間インキュベートする。最初の最適化実験のために、例えば、1x10<sup>5</sup>個の細胞を96ウエルプレートに播種し、記載されるようにしてsRNA複合体を加える。sRNAの細胞へのデリバリーの効率は、脂質と複合体化した蛍光sRNAを用いて決定する。6ウエルディッシュ中の細胞をsRNAとともに24時間インキュベートし、PBSですすぎ、2%パラホルムアルデヒド中で室温で15分間固定する。sRNAの取り込みは蛍光顕微鏡を用いて可視化する。

[0332]

TaqmanおよびサイクラーによるmRNAの定量

sRNAのデリバリーの後、例えば、6ウエル用にはQiagen RNA精製キットを、または96ウエルアッセイ用にはRneasy抽出キットを用いて、細胞から総RNAを調製する。Taqman分析のためには、5'末端に共有結合させたレポーター染料 (FAMまたはJOE) および3'末端にコンジュゲート化したクエンチナー染料TAMRAを有する二重標識プローブを合成する。1段階RT-PCR増幅は、例えば、ABI PRISM 7700 Sequence Detectorで、10 μlの総RNA、100 nMのプライマー、900 nMのリバースプライマー、100 nMのプライム、1XTaqman PCR反応緩衝液 (PE-Applied Biosystems)、5.5 mM MgCl<sub>2</sub>、300 μMの各dATP、dCTP、dGTP、およびdTTP、10 UのRNase阻害剤 (Promega)、1.25 UのAmplicon TaqGold (PE-Applied Biosystems) および10 UのM-M LVバーストランスクリプターゼ (Promega) から構成される50 μlの反応液を用いて行う。熱サイクルング条件は、48℃で30分間、95℃で10分間、次に95℃で15秒間および60℃で1分間を40サイクルからなるものでありうる。mRNAレベルの定量は、段階的に希釈した総細胞RNA (300, 100, 33, 11 ng/μl) から生成した標準に対して行い、平行してTaqman反応で測定したβ-アクトニンまたはGAPDH mRNAに対して標準化する。目的とする各遺伝子について、上側プライマーおよび下側プライマー、および蛍光標識したプローブを設計する。特定のPCR産物中へのSYBR Green I染料のリアルタイム取り込みは、ガラスキャピラリー管で光サイクラーを用いて測定することができる。対照cRNAを用いて、各プライマー対について標準曲線を作成する。値は、各サンプルにおいてGAPDHに対する相対的表現として表す。

[0333]

ラエスタンプロットインジ

核抽出物は、標準的なサイクログル製手法 (例えば、Andrews and Fallier, 1991, Nucleic Acids Research, 19, 2499を参照) を用いて調製することができる。例えばTCA沈殿を用いて、上清からの蛋白質抽出

物を調製する。等量の2.0% TCAを細胞上清に加え、氷上で1時間インキュベートし、5分間の遠心分離によりペレット化する。ペレットをアセトンで洗浄し、乾燥し、氷に溶解する。細胞蛋白質抽出物を10% Biotris NuPage (核抽出物) または4-12% Tris-グリシン (上清抽出物) ボリアクリルアミドゲルに流し、ニトロセルロース膜に移す。非特異的結合は、例えば、5% 無脂乳とともに1時間インキュベートすることによりブロッキングすることができ、次に一次抗体で4℃で16時間反応させる。洗浄した後、二次抗体、例えば (1:10, 000希釈) を室温で1時間適用し、SuperSignal 試薬 (Pierce) でシグナルを検出する。

#### [0334]

実施例8: HIV遺伝子発現のダウンスケーリングを評価するのに有用なモデル細胞培養

当該技術分野において一般に知られるように、本発明のsinaコンストラクトを種々の細胞培養系において用いて、抗HIV活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。B細胞、T細胞、マクロファージおよび内皮細胞培養系は、本発明のsina分子のスクリーニングに容易に適合させることができる細胞培養系の非限定的例である。非限定的例においては、本発明のsina分子は、Leeら (2002, Nature Biotechnology, 19, 500-505) に記載されるように、UG snRNAプロモーター-推進性発現系を用いて、HIV-1 pNL4-3プロウイルスDNAとともに293/EcR細胞にコトランスフェクションする。

#### [0335]

非限定的例においては、Leeら (上掲) に記載されるように、sina発現ベクターはpTZU6+1ベクターを用いて以下のように製造する。一方のカセットは21ヌクレオチドのセンス配列を有し、他方は21ヌクレオチドのアンチセンス配列 (表1) を有する。これらの配列は、本明細書に記載されるHIV-1 RNA標的を標的とするよう設計する。sinaメカニズムを確認するための対照として、HIV-1 (S/AS (IR)) に相補性を有しない無関係のセンスおよびアンチセンス (S/AS) 配列をpTZU6+1中にサテライトに挿入する。sinaまたは対照コンストラクトで過渡的にコトランスフェクションした293/EcR細胞からRNA試料を調製し、ポナステロンAで誘導する。RNAはまた、HIV-1 pNL4-3プロウイルスDNAおよびsinaまたは対照コンストラクトでコトランスフェクションした293細胞から調製する。sinaの抗HIV-1活性を測定するためには、上述したように、sinaコンストラクトおよび感染性HIV-1プロウイルスDNAであるpNL4-3で293細胞をコトランスフェクションし、当該技術分野において知られるようにノザンブロット分析を行うことにより、過渡的アッセイを行う。例えば、Dynatech MR5000 ELISAプレートリーダー (Dynatech Labs, Inc., Chantilly, VA) を利用してp24の値を計算する。細胞生存率はまた、トランスフェクションの4日後にトリパンブルー染料排除カウントを用いて評価する。

#### [0336]

抗HIV活性を有する化合物をスクリーニングするための他の細胞培養モデル系は当該技術分野において知られている。例えば、Duzgunesら (2001, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 20 (4-7), 515-523), Cagnunら (2000, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 10, 251), Hoら (1995, Stem Cell, 1, 13 suppl, 100) およびBaurら (1997, Blood, 89, 2259) は、本発明の組成物および本明細書に記載されるアッセイにおいて用いるために容易に適合させることができる細胞培養系を記載する。

#### [0337]

動物モデル

動物モデルにおいて抗HIV剤の効力を評価することは、ヒトの臨床試験の重要な前提条件である。本発明のsinaコンストラクトは、種々の動物モデルにおいて評価するこ

とができ、これらには、例えば、中空HIVモデル (例えば、Greenberg, 米国特許5, 627, 070を参照)、CD4プロモーターおよびエンボサースモデル (例えば、道伝子が発現するトランスジェニックマウスを用いるAIDS用のマウスモデル (Hilv, Jolicoeur, 国際公開WO98/50535を参照)、および/またはHilv/SIV/SHIV非ヒト霊長類モデル (例えば、Narayan, 米国特許5, 849, 994を参照) が含まれる。sina化合物およびウイルスは、本明細書に記載される、当該技術分野において知られるように、種々の方法および経路で投与することができる。これらのモデルにおける結果の定量は、種々の方法、例えば、定量的PCR、定量的およびバルク共培養アッセイ、血漿共培養アッセイ、抗原および抗体検出アッセイ、リンパ球増殖、細胞内サイトカイン、フローサイトメトリ、ならびに血液学およびCBC評価により行うことができる。さらに別の動物モデルは当該技術分野において一般に知られている。例えば、Bailら (2000, Mol. Ther., 1, 244) を参照。

#### [0338]

実施例9: HIV RNA発現のRNAi媒介性阻害

sinaコンストラクト (表11) を、例えば、293細胞において、HIV RNA発現を減少させる効力について試験する。トランスフェクションの時点で細胞が70-90% コントロールであるように、トランスフェクションの約24時間前に、96ウェルプレートに5, 000-7, 500細胞/ウェル、100μl/ウェルで細胞を播種する。トランスフェクションのために、アニーリングしたsinaを50μl/ウェルの容量でトランスフェクション試薬と混合し、室温で20分間インキュベートし、HIV-1 pNL4-3プロウイルスDNAとともに293細胞にコトランスフェクションする。sinaコンストラクト/ウイルス混合物を細胞に加えて、150μlの容量で最終sina濃度を25nMとする。各sinaコンストラクト/ウイルス混合物を3回のsina処理用3つのウェルに加える。細胞をsinaコンストラクト/ウイルス混合物の連続的存在下で37℃で24時間インキュベートする。24時間において、処理した細胞の各ウェルからRNAを調製する。まずトランスフェクション混合物を有する上清を除去して廃棄し、次に細胞を溶解し、各ウェルからRNAを調製する。処理後の遺伝子の発現を、標的遺伝子および標準化用に対照遺伝子 (36B4, RNAポリメラーゼサチュニット) についてRT-PCRにより評価する。さらに、ELISAを用いてHIV-1 p24ウイルス抗原レベルを測定することができる。3回の実験のデータを平均し、各処理について標準偏差を求める。標準化したデータをグラフに表し、活性なsinaによる標的mRNAの減少のパーセントをそれぞれの反転対照sinaと比較して判定する (例えば、Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 20, 500-505を参照)。

#### [0339]

非限定的例においては、リボヌクレオチドおよび3' 末端ジチオエチル基を含むsinaコンストラクト、ならびに、2'-デオキシ-2'-メチルオロビジンヌクレオチドおよびグリニリボヌクレオチドを含む、sinaのセンス鎖が5' および3' 末端反転デオキシ無塩基キヤップでさらに修飾されており、アンチセンス鎖が3' 末端ホスホチオエチルヌクレオチド間結合を含む、化学的に修飾されたsinaコンストラクトをアッセイする。表1Vに記載されるさらに別の安定な化学についても同様に活性をアッセイする。これらのsinaコンストラクトを、適当なマッピングした化学的反転対照と比較する。さらに、sinaコンストラクトはまた、未処理細胞、脂質およびスクリン化sinaコンストラクトでトランスフェクトした細胞、および脂質のみでトランスフェクトした細胞 (トランスフェクション対照) とも比較する。

#### [0340]

実施例10: 適応症

HIV研究における現在の知識は、研究、診断、および治療用途のために、HIV活性をアッセイする方法、およびHIV発現を制御しうる化合物が必要とされていることを示す。本明細書に記載されるように、本発明の核酸分子は、アッセイにおいてHIV

レベルに関連する疾病状態を診断するために用いることができる。さらに、核酸分子は、HIVレベルに関連する疾病状態を治療するために用いることができる。

### 【0341】

単独で、または他の療法との組み合わせで、HIV発現の調節と関連しうる特定の変性性および疾病状態としては、限定されないが、後天性免疫不全疾病(AIDS)および関連する疾病および状態、例えば、限定されないが、カボジ肉腫、リンパ腫、子宮頸癌、扁平上皮癌、心筋障害、リウマチ性疼痛、および日和見感染、例えば、Pneumocystis carinii, サイトメガロウイルス、ヘルペス単純ウイルス、ミコプラズマ、クリプトコッカス、トキソプラズマ、進行性多病巣性脳神経障害(パボウイルス)、ミコプラズマ、アスペルギルス、クリプトコッカス、カンジダ、クリプトスポリジウム、Isospora belli, ミクロスポリジウム、および細胞または組織中のHIVのレベルに関連するがそれに対応するであろう他の任意の疾病または状態が含まれる。

### 【0342】

HIV研究における現在の知識は、研究、診断、および治療用途のために、HIV活性をアッセイする方法およびHIV発現を制御しうる化合物が必要とされていることを示す。

### 【0343】

抗ウイルス化合物、モノクローナル抗体、化学療法剤、放射線療法、鎮痛剤、および/または抗炎症性化合物の使用はすべて、本発明の核酸分子(例えば、リボサイルムおよび/またはセンス分子)と組み合わせる併用しうる方法の非限定的例である。本発明の核酸分子と併用しうる抗ウイルス化合物の例としては、限定されないが、AZT(ジドジジンまたは2DVとしても知られる)、ddC(zalcitabine)、ddI(ジデオキシイリジン)、dT(sstavudine)、および3TC(lamivudine)リバビリン、デルバリジン(Rescriptor)、ネビラピン(Viramune)、エトラビリン(Sustiva)、リトナビル(Norvir)、ザラニビル(In Virase)、インジナビル(Crixivan)、アプタニビル(Agenera se)、ネルフィナビル(Viracept)、および/またはロピナビル(Kaletra)が挙げられる。本発明の核酸分子と組み合わせることができる慣用的な化学療法剤には、結核菌を殺すための細胞毒性剤の種々の組み合わせが含まれる。これらの薬剤としては、限定されないが、バクリタキセル(タキソール)、ドセタキセル、シスプラチン、メトトレキサート、シクロホスファミド、ドキソルビン、フルオロウラシル、カルボプラチン、エタトトレキサート、ゲムシタジンおよび/またはフルビドが挙げられる。当業者は、他の薬剤化合物および療法を同様に本発明の核酸分子(例えば、リボサイルム、sRNAおよびアプタニビル分子)と容易に組み合わせることができる、したがって本発明の範囲内であることを理解するであろう。

### 【0344】

#### 実施例13: 診断用途

本発明のsRNA分子は、種々の応用において、例えば、臨床、工業、環境、農業および/または研究の設定において、種々の診断用途、例えば分子標的(例えばRNA)の同定に用いることができる。そのようなsRNA分子の診断における使用は、再構成されたRNAi系、例えば、細胞溶解剤または部分的に精製された細胞溶解剤を利用することを含む。本発明のsRNA分子を診断手段として使用し、疾病に罹患した細胞内の遺伝的浮動および変異を検査するか、または細胞において内因性または外来の(例えばウイルス)RNAの存在を検出することができる。sRNA活性と標的RNAの構造との間の密接な関係により、分子のいずれの領域においても、標的RNAの塩基対形成および3次元構造を変更する変異を検出することができる。本発明に記載されるsRNA分子を複数使用することにより、インビトロならびに細胞および組織におけるRNAの構造および機能に重要なヌクレオチド変異を阻害し、疾病または感染の進行における特定の遺伝子産物の役割を明らかにすることができる。このようにして、他の遺伝子標的を疾病の重要

な介在物として明らかにすることができる。これらの実験は、組み合わせ療法の可能性を提供することにより、疾病進行のよりよい治療につながるであろう(例えば、異なる遺伝子を標的とする多数のsRNA分子、既知の小分子阻害剤と組み合わせさせたsRNA分子、sRNA分子および/または他の化学的または生物学的分子と組み合わせさせた間欠的治療)。本発明のsRNA分子の他のインビトロにおける使用は当該技術分野においてよく知られており、これには、疾病、感染または関連する健康状態に伴うmRNAの存在の検出が含まれる。そのようなRNAは、sRNA分子で処理した後、標準的な方法論、例えば蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を使用して切断産物の存在を判定することにより検出する。

### 【0345】

特定の例においては、標的RNAの野生型または変異型のみが切断できないsRNA分子をアッセイに使用する。第1のsRNA分子(すなわち、野生型の標的RNAのみを切断するもの)を用いて試料中の野生型RNAの存在を同定し、第2のsRNA分子(すなわち、変異型の標的RNAのみを切断するもの)を用いて試料中の変異型RNAを同定する。反応対照として、野生型および変異型の両方のRNAの合成基質を両方のsRNA分子で切断し、反応におけるsRNA分子の相対効率および"非標的"RNA種を切断しないことを明らかにする。合成基質からの切断産物は、試料集団中の野生型および変異型RNAの分析のためのサイスワーカ一の生成にも役立つ。したがって、それぞれの分析は2つのsRNA分子、2つの基質、および1つの未知の試料を必要とし、これらを組み合わせる6つの反応を行う。切断産物の存在をRNAase保護アッセイを用いて確認し、各RNAの完全長および切断フラグメントをポリアクリルアミドゲルのレーンで分析できるようにする。標的細胞における変異体RNAの発現および所望の表現型の変化の推定されるリスクへの洞察を得るために、必ずしも結果を定量化する必要はない。その蛋白質産物が変異型(すなわち、疾病に関連する)かまたは感染に関連する)の発生に関与することが示唆されるmRNAの発現はリスクを確立するのに十分である。同等の比活性のプロトコルを両方の転写産物に使用すれば、RNAレベルの定性的比較で十分であり、初期の診断のコストが低減する。RNAレベルを定性的に比較するにしても定量的に比較するにしても、より高い変異型と野生型の比率はより高いリスクと相関関係があるであろう。

### 【0346】

本明細書において言及されるすべての特許および刊行物は、本発明の属する技術分野の技術者のレベルを示す。本明細書において引用されるすべての参考文献は、それぞれの参考文献が個々にその全体が本明細書の一部としてここに引用されることと同じ程度に、本明細書の一部として引用される。

### 【0347】

当業者は、本発明が、その目的を実施し、記載される結果および利点、ならびに本明細書に固有のものを得るためによく適合していることを容易に理解するであろう。本明細書に記載される方法および組成物は、現在のところ好ましい態様の代表的なものであり、例示的なものであつて、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。当業者は、特許請求の範囲において定義される本発明の精神の中に包含される変更および他の用途をなすであろう。

### 【0348】

当業者は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示される本発明に対して種々の置換および変更をなすことが可能であることを容易に理解するであろう。すなわち、そのような追加の置換は、本発明および特許請求の範囲の範囲内である。本発明は、RNAi活性を媒介する改良された活性を有する核酸コンストラクトを得るために本明細書に記載される化学的修飾の種々の組み合わせおよび/または置換を試験することとを当業者は教示する。そのような改良された活性は、改良された安定性、改良された生物利用性、および/またはRNAiを媒介する細胞応答の改良された活性化を含むことができる。したがって、本明細書に記載される特定の態様は限定ではなく、当業者は、改良されたRNAi活性を有するsRNA分子を同定するために、過度の実験なしに本明細書

に記載される修飾の特定の組み合わせを試験しうることを容易に理解することができる。

【0349】

本明細書に例示的に記載されている発明は、本明細書に特定の範囲を示していない任意の要素または限定なしでも適切に実施することができる。すなわち、例えば、本明細書における各例において、“...を含む”、“...から本質的になる”および“...からなる”の用語は、他の2つのいずれかと置き換えることができる。本明細書において用いられる用語および表現は、説明の用語として用いるものであり、限定ではない。そのような用語および表現の使用においては、示されかつ記載されている特徴またはその一部の等価物を排除することを意図するものではなく、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲中で種々の変更が可能であることが理解される。すなわち、好ましい特徴および任意の特徴により本発明を特定の範囲に開示してきたが、当業者には本明細書に記載される概念の変更および変種が可能であり、そのような変更および変種も特許請求の範囲に定義される本発明の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。

【0350】

さらに、発明の特徴および観点がワーカブルまたは他の代替グループの用語で記載されている場合、当業者は、本発明が、ワーカブルまたは他のグループの個々のメンバーまたはサブグループに関連してもまた記載されていることを認識するであろう。

【0351】

10

【表1】

表1: HIV 受託番号

受託番号	名前	サブタイプ
AB032740	95TNIH022	01 AE
AB032741	95TNIH047	01 AE
AB052895	93JPNH1	01 AE
AB070352	NH25 93JPNH25T 93JP-NH25T	01 AE
AB070353	NH2 93JPNH2ENV	01 AE
AF164485	93TH021	01 AE
AF197338	93TH057	01 AE
AF197339	93TH065	01 AE
AF197340	90CF11697 AF197340	01 AE
AF197341	90CF4071 AF197341	01 AE
AF289954	CM235-2	01 AE
AF289955	CM235-4	01 AE
AY008714	97CNGX2F 97CNGX-2F	01 AE
AY008718	97CNGX11F	01 AE
U51188	90CF402 90CF402 CAR-E 4002	01 AE
U51189	93TH253	01 AE
U54771	CM240	01 AE
AF369964	NP1623	01B
AY082968	TH1328 AY082968	01B
AJ404325	97DCKTB49 97CDKTB49	01GHIKU
AB049811	HIM404325	02 AG
AB052867	AB052867	02 AG
AF063223	DJ263	02 AG
AF063224	DJ264	02 AG
AF107770	SE7812	02 AG
AF184155	Q829	02 AG
AF377954	CM52865 AF377954	02 AG
AF377955	CM53668 AF377955	02 AG
AJ251056	MP1211 98SE-MP1211	02 AG
AJ251057	MP1213 98SE-MP1213 HIN251057	02 AG
AJ286133	97CMA-MP807	02 AG
L39105	IBNG	02 AG
AF193276	KAL153-2	03 AB
AF193277	RUG8001 98RU001	03 AB
AF414006	98BY10443 AF414006	03 AB
AF048337	94CY032-3 CY032-3	04 GY
AF119819	97P/MNY GHR4	04 GY
AF119820	97P/MNY GHR11	04 GY
AF076998	VH61	05 DF
AF193253	M1310 AF193253	05 DF
AF064699	BFP90	06 GY
AJ245481	95MIL34	06 GY
AJ288981	97SE1078	06 GY
AJ288982	95MIL127	06 GY
AF286226	97CNU01 C54	07 BC
AF286230	98CNU09	07 BC
AX149647	C54A C54	07 BC
AX149672	C54D AX149672	07 BC
AX149771	CN54b	07 BC
AX149898	C54C	07 BC

40

30

20

50

【表 2】

AF286229	98CND08	08 BC
AY008715	97CNGX6F	08 BC
AY008716	97CNGX7F	08 BC
AY008717	97CNGX9F	08 BC
AF289548	96T2BF061	10 CD
AF289549	96T2BF071	10 CD
AF289550	96T2BF10	10 CD
AF179368	GR17	11 GPX
AJ291718	MP818	11 GPX
AJ291719	MP1298	11 GPX
AJ291720	MP1307	11 GPX
AF388934	UFTT23	12 BF
AF388935	UFTT35	12 BF
AF388936	ARMA159	12 BF
AF408629	A32879 AF408629	12 BF
AF408630	A32889 AF408630	12 BF
AY037279	ARMA185	12 BF
AF423756	X397 AF423756	14 BG
AF423757	X421 AF423757	14 BG
AF423758	X475 AF423758	14 BG
AF423759	X477 AF423759	14 BG
AF450096	X605 AF450096	14 BG
AF450097	X623 AF450097	14 BG
AF099699	SE8938	A
AF089671	SE7535	A
AF089673	SE8691	A
AF107771	UGSE8131	A
AF193275	97BL06 AF193275	A
AF361872	97T202 AF361872	A
AF361873	97T203 AF361873	A
AF413987	98UJ0116 AF413987	A
AF004885	C23-17	A1
AF069670	SE7293	A1
M62320	U465 U465A	A1
U51190	92UG037	A1
AF286237	94CY01741	A2
AF286238	97CDKTB48	A2
U86780	ZAMT84	A2C
AF286239	97GK004	A2D
AF316544	97CDKPS8	A2G
AF067166	95N21301	AC
AF071474	SE9488	AC
AF361871	97T201 AF361871	AC
AF361878	97T208 AF361878	AC
AF361878	97T208 AF361878	AC
AF361879	97T209 AF361879	AC
U88923	92RW009	AC
AF075702	SE8603	ACD
AJ276595	VH1035	ACG
AF071473	SE7108	AD
AJ237565	SE8954	AD
X04415	MAL MALCG	ADHK
AF377959	CM53379 AF377959	ADK
AF377957	CM53392 AF377957	AG

【表 3】

AJ276596	VH1197	AG
U88925	92NG003	AG
AF076474	V1354	AGU
AF192135	BW2117	AGU
AJ293865	B76 HIL293865	AGU
AF099672	SE6994	AU
A04321	IIB LAI	B
AB078005	ARE52 AB078005	B
AF003887	WC001	B
AF003888	NL3WC001	B
AF004394	AD87 ADA	B
AF033919	HXB2-60DY LAI	B
AF042100	MBC200	B
AF042101	MBC925	B
AF042102	MBC18 MBC18	B
AF042103	MBC54	B
AF042104	MBC098	B
AF042105	MBCD36	B
AF042106	MBC18R01 C18R01	B
AF049194	499LC16	B
AF049495	NC7	B
AF069140	DH123	B
AF070521	NL4389 LAI IIB/NY5	B
AF075719	MNTQ MNDoneTO	B
AF098817	TVCCYS LMA9	B
AF146728	VH	B
AF224507	WK	B
AF256204	S6111 AF256204	B
AF256205	S61D15 AF256205	B
AF256206	S61G1 AF256206	B
AF256207	S61G7 AF256207	B
AF256208	S61115 AF256208	B
AF256209	S61K1 AF256209	B
AF256210	S61K15 AF256210	B
AF256211	S61D1	B
AF286365	WF27	B
AJ006287	89SP061 89ES061	B
AJ271445	GB8 GB8-46R HIL271445	B
AJ078307	BH10	B
AY037268	ARCH054	B
AY037269	ARMS008	B
AY037270	BOL122	B
AY037274	ARMA173	B
AY037282	ARMA132	B
D10112	CAM1	B
DB0808	MCK1	B
DB6059	PM213	B
K02007	SF2 LAV2 ART2	B
K02013	LAI BRU	B
K02083	PV22	B
K03455	HXB2 HXB2CG HXB21 LAI	B
L02317	BC BC03G3	B
L31963	TH4754 LAI	B
M19554	BH102 BH10	B
M17449	MNCG MN	B

【表 4】

M7451	FF HAT3	B
M7921	NL43 DNL43 NL4-3	B
M6727	OYL 397	B
M6849	JRCSE JR-CSF	B
M69431	NYSCG	B
M63258	YUE YUEX	B
M63259	YU10	B
NG-001802	HYX2H	B
U12055	LW123	B
U21135	WEALU60 GHOSH	B
U23487	contaminant MANC	B
U26546	WRZ7	B
U26942	NL4-3 LAI/NY5 DNL43 NL43	B
U34603	H0320-2A12 ACH3202A12	B
U34604	3202A21 ACH3202A21	B
U37270	C18MBC	B
U38362	P898 89.6	B
U43098	D81	B
U43141	HAN	B
U63832	JRFL JR-FL	B
U63584	85WCIPR54	B
U65655	WCIPR854	B
U68586	WCIPR8546	B
U69387	WCIPR8552	B
U69589	WCIPR855	B
U69590	WCIPR9011	B
U69591	WCIPR9012	B
U69592	WCIPR9018	B
U69593	WCIPR9031	B
U69593	WCIPR9032	B
U71182	FL42	B
X01762	REHTLV3 LAI IIB	B
Z11530	F12CG	B
AF332867	A027 AF332867	BF
AF408626	A025 AF408626	BF
AF408627	A047 AF408627	BF
AF408628	A063 AF408628	BF
AF408631	A050 AF408631	BF
AF408632	A32878 AF408632	BF
AY037266	ARCH014	BF
AY037267	ARCH003	BF
AY037271	BOL137	BF
AY037272	UTR17	BF
AY037273	AFMA062	BF
AY037275	AFMA036	BF
AY037276	AFMA070	BF
AY037277	AFMA037	BF
AY037278	AFMA008	BF
AY037280	AFMA097	BF
AY037281	AFMA038	BF
AY037283	AFMA029	BF
AF005495	53BF029.4	BF1
AF423755	X254 AF423755	BG
AB023804	93IN101	C
AF067154	93IN989 301989	C

【 0 3 5 5 】

【表 5】

AF067155	95IN21068	C
AF067157	93IN504 301904	C
AF067158	93IN505 301905	C
AF067159	94IN11246	C
AF110959	96BW01B03 96BW01B03	C
AF110960	96BW01B21	C
AF110961	96BW01B22	C
AF110962	96BW0402	C
AF110963	96BW0407	C
AF110964	96BW0408	C
AF110965	96BW0409	C
AF110966	96BW0410	C
AF110967	96BW0502	C
AF110968	96BW0504	C
AF110969	96BW1104	C
AF110970	96BW1106	C
AF110971	96BW11B01	C
AF110972	96BW1210	C
AF110973	96BW15B03	C
AF110974	96BW15C02	C
AF110975	96BW15C05	C
AF110976	96BW15B01	C
AF110977	96BW16D14	C
AF110978	96BW1626	C
AF110979	96BW17A09	C
AF110980	96BW17B03	C
AF110981	96BW17B05	C
AF286223	94IN476	C
AF286224	96ZM651	C
AF286225	96ZM751	C
AF286227	97ZA012	C
AF286228	98BH004	C
AF286231	98IND12	C
AF286232	98IND22	C
AF286233	98IS002	C
AF286234	98TZ013	C
AF286235	98TZ017	C
AF290027	96BW06H51 96BW06-H51	C
AF290028	96BW06J4	C
AF290029	96BW06J7 AF290029	C
AF290030	96BW06K18 AF290030	C
AF321523	ML4	C
AF361874	97TZ04 AF361874	C
AF361875	97TZ05 AF361875	C
AF443074	96BWM015	C
AF443075	96BWM032 AF443075	C
AF443076	96BWM0122 AF443076	C
AF443077	96BWM0134 AF443077	C
AF443078	96BWM0149 AF443078	C
AF443079	96BWM01410 AF443079	C
AF443080	96BWM018D5 AF443080	C
AF443081	96BWM036A5 AF443081	C
AF443082	96BWM037D5 AF443082	C
AF443083	96BWM038212 AF443083	C
AF443084	96BWM046424 AF443084	C

【 0 3 5 6 】



【表 6】

AF443085	99BW47458 AF443085	C
AF443086	99BW47547 AF443086	C
AF443087	99BWMCI68 AF443087	C
AF443088	00BW07821 AF443088	C
AF443089	00BW07820 AF443089	C
AF443090	00BW087421 AF443090	C
AF443091	00BW147127 AF443091	C
AF443092	00BW16182 AF443092	C
AF443093	00BW1686 00BW16868 AF443093	C
AF443094	00BW17593 AF443094	C
AF443095	00BW17732 AF443095	C
AF443096	00BW17835 AF443096	C
AF443097	00BW17956 AF443097	C
AF443098	00BW18113 AF443098	C
AF443099	00BW18595 AF443099	C
AF443100	00BW18802 AF443100	C
AF443101	00BW182113 AF443101	C
AF443102	00BW20361 AF443102	C
AF443103	00BW20636 AF443103	C
AF443104	00BW20872 AF443104	C
AF443105	00BW2127214 AF443105	C
AF443106	00BW21283 AF443106	C
AF443107	00BW22767 AF443107	C
AF443108	00BW38193 AF443108	C
AF443109	00BW38428 AF443109	C
AF443110	00BW38713 AF443110	C
AF443111	00BW38789	C
AF443112	00BW38868	C
AF443113	00BW38916	C
AF443114	00BW39702	C
AF443115	00BW50311	C
AY043173	DU151 AY043173	C
AY043174	DU179 AY043174	C
AY043175	DU422 AY043175	C
AY043176	CTSC2 AY043176	C
U46016	ETH2220 C2220	C
U52953	92BH025	C
AF361877	97TZ07 AF361877	CD
AY074891	00BWM0351 AY074891	CD
AF133821	MB2059	D
AJ320484	HIM320484	D
K03454	ELI	D
M22639	Z226 Z2 CDC-Z34	D
M27323	NDK	D
U88822	84ZRH05	D
U88824	94UG1141	D
AF005494	93BF020.1	F1
AF075703	FIN363	F1
AF077336	VIB50	F1
AJ248238	MP411 96FRMP411	F1
AF377956	CM53657 AF377956	F2
AJ248236	MP285 95CMMP285	F2
AJ248237	MP267 95CMMP267C	F2
AF076475	VH1128	FKU
AF061940	HH8793-1.1	G

【 0 3 5 7 】

50

【表 7】

AF061641	HH8793-12.1	G
AF061642	SE6165 G6165	G
AF084936	DRCBL	G
AF423760	X558 AF423760	G
AF450098	X138 AF450098	G
U88826	92NG083 JV10832	G
AF005486	90CF056 90CF056	H
AF190127	V/991	H
AF190128	V/997	H
AF082394	SE7887 SE92809	J
AF082395	SE7022 SE9173	J
AJ249235	EQTB11C97ZH-EQTB11C	K
AJ249239	MP535 96CMMP535C	K
AJ230083	97CAJMP645MO	MO
AJ008022	YBF30	N
AJ271370	YBF106	N
AF407418	VAU AF407418	O
AF407419	VAU AF407419	O
AJ302646	SEMP1299 HIN302646	O
AJ302647	SEMP1300 HIN302647	O
L20571	MP/PS180	O
L20587	ANT70	O
NC 002787	SEMP1299 NC 002787	O
AF286236	83CD003 Z9 AF286236	U
AF457101	90CD121E12 AF457101	U
AY046058	GR303 99GR303 AY046058	U

【 0 3 5 8 】

20

表 II: HIV siNA および標的配列

標的配列	配列番号	上側配列	配列番号	下側配列	配列番号
UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	UUUGCUGGUCUUUCCAAA	739
CAGGAGCAGAUACAGU	2	CAGGAGCAGAUACAGU	2	ACUGUAUACUCUGCCUG	740
AGAAAAGGGGGGAUUGGGG	3	AGAAAAGGGGGGAUUGGGG	3	CCCCAAUCCCCCUUUUCU	741
GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	UAAUCCUACUCUGUCUAC	742
ACAGGAGCAGAUACAG	5	ACAGGAGCAGAUACAG	5	CUGUAUACUCUGCCUGU	743
GAAAAGGGGGGAUUGGGG	6	GAAAAGGGGGGAUUGGGG	6	CCCCAAUCCCCCUUUUC	744
UUAGAUACAGGAGCAGAU	7	UUAGAUACAGGAGCAGAU	7	CAUCUGCUCUGUAUCUAA	745
UAGAUACAGGAGCAGAU	8	UAGAUACAGGAGCAGAU	8	UCAUCUGCUCUGUAUCUA	746
AGCAGAAGACAGUGGCAU	9	AGCAGAAGACAGUGGCAU	9	AUUGCCACUGUCUUCUGCU	747
AUUAAGAUACAGGAGCAGAU	10	AUUAAGAUACAGGAGCAGAU	10	AUCUGCUCUGUAUCUAAU	748
AUACAGGAGCAGAUAC	11	AUACAGGAGCAGAUAC	11	GUUAUCUGCUCUGUAUCU	749
GAGCAGAAGACAGUGGCAA	12	GAGCAGAAGACAGUGGCAA	12	UUGCCACUGUCUUCUGCUC	750
AGAGCAGAAGACAGUGGCA	13	AGAGCAGAAGACAGUGGCA	13	UGCCACUGUCUUCUGCUCU	751
GCAGAAGACAGUGGCAU	14	GCAGAAGACAGUGGCAU	14	CAUUGCCACUGUCUUCUGC	752
AGAUACAGGAGCAGAU	15	AGAUACAGGAGCAGAU	15	AUCAUCUGCUCUGUAUCU	753
UACAGGAGCAGAUAC	16	UACAGGAGCAGAUAC	16	UGUAUCAUCUGCUCUGUA	754
UAUUAGAUACAGGAGCAG	17	UAUUAGAUACAGGAGCAG	17	UCUGCUCUGUAUCUAAUA	755
GAUACAGGAGCAGAU	18	GAUACAGGAGCAGAU	18	UAUCAUCUGCUCUGUAUC	756
AUGGAAAACAGAUAGGCA	19	AUGGAAAACAGAUAGGCA	19	CCUGCCACUGUCUUCUCCAU	757
GUCAACAUAUUGGAAGAA	20	GUCAACAUAUUGGAAGAA	20	UUUUUCCAAUUAUGUUGAC	758
UAUGGAAAACAGAUAGGCA	21	UAUGGAAAACAGAUAGGCA	21	CUGCCACUGUCUUCUCCAU	759
AUGAUAGGGGGAUUGGAG	22	AUGAUAGGGGGAUUGGAG	22	CUCCAAUCCCCCUUAUCA	760
CAGAAGACAGUGGCAU	23	CAGAAGACAGUGGCAU	23	UCAUUGCCACUGUCUUCUG	761
CAUUGGCCAUUGACAGAA	24	CAUUGGCCAUUGACAGAA	24	CUUCUGUCUUAUGGCCAUUG	762
UCAACAUAUUGGAAGAAA	25	UCAACAUAUUGGAAGAAA	25	UUUUUCCAAUUAUGUUGA	763
AAUGGCCAUUGACAGAA	26	AAUGGCCAUUGACAGAA	26	UCUUCUGUCAUUGGCCAUU	764
UGAUAGGGGGAUUGGAG	27	UGAUAGGGGGAUUGGAG	27	CCUCCAAUCCCCCUUAUCA	765
GACAGGCUAUUAUUAAG	28	GACAGGCUAUUAUUAAG	28	CCUAAAAAUUAAGCCUGUC	766
AUUUUCGGGUUAUUAACAG	29	AUUUUCGGGUUAUUAACAG	29	CUGUAUUAACCCGAAAU	767
CUAUUAGAUACAGGAGCAG	30	CUAUUAGAUACAGGAGCAG	30	CUGCUCUGUAUCUAAUAG	768

40

30

20

10

AGACAGGCUAAUUUUUAG	31	AGACAGGCUAAUUUUUAG	31	CUAAAAAUUAGCCUGUCU	769
AAUAGAUAGGGGGAUUGG	32	AAUAGAUAGGGGGAUUGG	32	CCAAUUCGCCCUAUAUUU	770
UAUUGGCAAGCAGGAGCU	33	UAUUGGCAAGCAGGAGCU	33	AGCUCUCCUGCUUGCCAU	771
UAGAUUGGGCAAGCAGGGA	34	UAGAUUGGGCAAGCAGGGA	34	UCCUGCUCUUGCCAUACUA	772
GAAAACAGAUUGGCAUGA	35	GAAAACAGAUUGGCAUGA	35	UCACUGCCAUUCGUUUUC	773
ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	CAGCUUCCUUAUGAUGGU	774
AAUAGAUAGGGGGAUUGGA	37	AAUAGAUAGGGGGAUUGGA	37	UCCAAUUCGCCCUAUAUU	775
UGGAAAACAGAUUGGCAUG	38	UGGAAAACAGAUUGGCAUG	38	ACCUGCCAUUCGUUUUCCA	776
GGAAAACAGAUUGGCAUG	39	GGAAAACAGAUUGGCAUG	39	CACCUGCCAUUCGUUUUCC	777
GAUUAUGGAAAACAGAUUG	40	GAUUAUGGAAAACAGAUUG	40	CCAUCUGUUUCCAUAAUC	778
AAAAUGAUAGGGGGAUUG	41	AAAAUGAUAGGGGGAUUG	41	CAAUUCCGCCCUAUAUUU	779
UGGAAAGGUUAAGGGGCA	42	UGGAAAGGUUAAGGGGCA	42	CUGCCCUUACGUUUUCCA	780
AUCAUAGAGGAAGCUCAG	43	AUCAUAGAGGAAGCUCAG	43	CUGCAGCUUCCAUUAUG	781
UGGAAACCAAAAUAGUAG	44	UGGAAACCAAAAUAGUAG	44	CUAUAUUUUGGUUUCCA	782
CCAUCAUAGAGGAAGCUG	45	CCAUCAUAGAGGAAGCUG	45	GCAGCUUCCAUUAUGG	783
AGGGAUUAUGGAAAACAGA	46	AGGGAUUAUGGAAAACAGA	46	UCUGUUUUUCCAUAAUCCU	784
GGAAACCAAAAUAGUAG	47	GGAAACCAAAAUAGUAG	47	CCUUAUUAUUUGGUUUCC	785
UAGGGGGAUUGGAGGUUU	48	UAGGGGGAUUGGAGGUUU	48	AAACGUCCAAUCCCCCUA	786
UACAGUGCAGGGGAAAGAA	49	UACAGUGCAGGGGAAAGAA	49	UUCUUUCCCGUCACUGUA	787
CUCUAUUAUAGAUACAGGAG	50	CUCUAUUAUAGAUACAGGAG	50	GCUCUGUAUUAUUAAGAG	788
GGAUUAUGGAAAACAGAU	51	GGAUUAUGGAAAACAGAU	51	CAUCUGUUUCCAUAAUCC	789
CCAAAUAUAGUGGGGGA	52	CCAAAUAUAGUGGGGGA	52	UUCUCCCUAUAUUUUUG	790
AUGGAAACCAAAAUAGUA	53	AUGGAAACCAAAAUAGUA	53	UAUCAUUUUUGGUUUCCA	791
CAGUGCAGGGGAAAGAAUA	54	CAGUGCAGGGGAAAGAAUA	54	UAUUCUUUCCCGUCACUG	792
ACAAUGGCCAUUGACAGAA	55	ACAAUGGCCAUUGACAGAA	55	UUCUGUCAUUGGCCAUUG	793
CCAUGCAUUGGACAGUAGA	56	CCAUGCAUUGGACAGUAGA	56	UCUACUUGUCCAUUGG	794
AUUAUGGAAAACAGAUUG	57	AUUAUGGAAAACAGAUUG	57	GCCAUUCGUUUUCCAUAAU	795
AACAUGGCCAUUGACAGA	58	AACAUGGCCAUUGACAGA	58	UCUGUCAUUGGCCAUUGU	796
AAAAUGAUAGGGGGAUUA	59	AAAAUGAUAGGGGGAUUA	59	AAUUCUCCCUAUAUUUUU	797
GCCAUGCAUUGGACAGUAG	60	GCCAUGCAUUGGACAGUAG	60	CUACUUGUCCAUUGGCG	798
UAGCAGGAAGAUUGGCCAGU	61	UAGCAGGAAGAUUGGCCAGU	61	ACUGGCCAUUCCUGCUA	799
CAAAAUAUAGGGGGAUUA	62	CAAAAUAUAGGGGGAUUA	62	AUUCUCCCUAUAUUUUU	800
AAGAAUAUAGACAGCAUG	63	AAGAAUAUAGACAGCAUG	63	CAUGCUGUAUUAUUUCU	801
UCUAUUAGAUACAGGAGCA	64	UCUAUUAGAUACAGGAGCA	64	UGCUCUGUAUUAUUAAGA	802
GCUCUAUUAUAGACAGGAG	65	GCUCUAUUAUAGACAGGAG	65	CUCCUGUAUUAUUAAGC	803
CAGGCUAAUUUUUAGGGA	66	CAGGCUAAUUUUUAGGGA	66	UCCUAAAAAUUAGCCUG	804

40

30

20

10

AGGAGCAGAUGAUACAGUA	67	AGGAGCAGAUGAUACAGUA	67	UACUGUAUCAUCUGCUCU	805
AAACAAGGCCAUUGACAG	68	AAACAAGGCCAUUGACAG	68	CUGUCAAGGCCAUUGUUU	806
CGGGUUUAUUAACAGGACA	69	CGGGUUUAUUAACAGGACA	69	UGUCCCUUAUAAACCCG	807
CAACAUAUUGGAAGAAAU	70	CAACAUAUUGGAAGAAAU	70	AUUUCUCCAAUUAUGUUG	808
UCAUAGAGGAAGCUCGAGA	71	UCAUAGAGGAAGCUCGAGA	71	UCUGCAGCUCCCAUUGA	809
GGAAAGGUGAAGGGGCGAGU	72	GGAAAGGUGAAGGGGCGAGU	72	ACUGCCCUUCCACCUUCC	810
UUUCGGGUUAUUAACAGGG	73	UUUCGGGUUAUUAACAGGG	73	CCCUGAAUAAACCCGAAA	811
UCGGGUUAUUAACAGGGAC	74	UCGGGUUAUUAACAGGGAC	74	GUCCCGUUAUAAACCCGA	812
ACAGUGCAGGGGAAAGAAU	75	ACAGUGCAGGGGAAAGAAU	75	AUUCUUUCCCGCAGCUGU	813
AUGCAUGGACAAGUAGACU	76	AUGCAUGGACAAGUAGACU	76	AGUCUACUUGUCCAUAGCAU	814
AAGCCAUGCAUGGACAAGU	77	AAGCCAUGCAUGGACAAGU	77	ACUUUGUCCAUUGGCUU	815
AGCCAUGCAUGGACAAGUA	78	AGCCAUGCAUGGACAAGUA	78	UACUUGUCCAUUGGCUU	816
GCAUUAUCAGAAGGAGCCA	79	GCAUUAUCAGAAGGAGCCA	79	UGGCUCUUCUGAUAAUGC	817
AAUUGGAGAAGUGAAUUAU	80	AAUUGGAGAAGUGAAUUAU	80	AUAUUAUCACUUCUCCAAU	818
AGAAAAAUCAGUAACAGU	81	AGAAAAAUCAGUAACAGU	81	ACUGUUAUCUGAUUUUUCU	819
GAAGCCAUGCAUGGACAAG	82	GAAGCCAUGCAUGGACAAG	82	CUUGUCCAUUGGCUUCC	820
ACAGGCUAAUUUUUAGGG	83	ACAGGCUAAUUUUUAGGG	83	CCCUAAAAAUUAGCCUGU	821
GAAGAAUAGUAGCAGCAU	84	GAAGAAUAGUAGCAGCAU	84	AUGCUGUACAUUUUUCU	822
UUUCGGGUUAUUAACAGG	85	UUUCGGGUUAUUAACAGG	85	CCUGUAAUAAACCCGAAA	823
ACCAAAUAGUAGGGGGA	86	ACCAAAUAGUAGGGGGA	86	UCCCCCUAUAUUUUGGU	824
GAAGUGACAUAGCAGGAAC	87	GAAGUGACAUAGCAGGAAC	87	GUUCCGCUAUGUCACUUC	825
UUCGGGUUAUUAACAGGGA	88	UUCGGGUUAUUAACAGGGA	88	UCCCUUAUAAACCCGAAA	826
AUAGGGGGAUUGGAGGUU	89	AUAGGGGGAUUGGAGGUU	89	AACCUCCAAUUCUCCCUAU	827
AGAAGAAUAGUAGCAGCA	90	AGAAGAAUAGUAGCAGCA	90	UGCUGUACAUUUUUCUUCU	828
AUUGGAGAAGUGAAUUAU	91	AUUGGAGAAGUGAAUUAU	91	UAUUAUUCACUUCUCCAAU	829
GGAAGUGACAUAGCAGGAA	92	GGAAGUGACAUAGCAGGAA	92	UUCCUGCUAUGUCACUUC	830
AGGCUAAUUUUUAGGGAA	93	AGGCUAAUUUUUAGGGAA	93	UUCCCUAAAAAUUAGCCU	831
UUAUGGAAACAGAUUGGCA	94	UUAUGGAAACAGAUUGGCA	94	UGCCAUUCGUUUUCCAUAA	832
GGGAUUAUGGAAACAGAU	95	GGGAUUAUGGAAACAGAU	95	AUCUGUUUCCCAUAAUCC	833
UAGAAGAAUAGUAGCAGC	96	UAGAAGAAUAGUAGCAGC	96	GCUGUACAUUUUUCUUA	834
AGCUCUAUUAAGAUACGGA	97	AGCUCUAUUAAGAUACGGA	97	UCCUGUACUUAUAGAGCU	835
GUUAGGGCAAGCAGGGAGC	98	GUUAGGGCAAGCAGGGAGC	98	GCUCCUGCUUCCCAUAC	836
CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	GCCAUAGGAGAUGCCUAG	837
GCAGGAACUACUAGUACCC	100	GCAGGAACUACUAGUACCC	100	GGGUACUAGUAGUCCUGC	838
GGGGAAGUGACAUAGCAGG	101	GGGGAAGUGACAUAGCAGG	101	CCUGCUAUGCACUCCCC	839
UACAAUCCCAAAGUCAAG	102	UACAAUCCCAAAGUCAAG	102	CUUGACUUUGGGGAUUGUA	840

UUCCCUACAAUCCCAAAG	103	UUCCCUACAAUCCCAAAG	103	CUUUGGGGAUUGUAGGGAA	841
AAGCUCUAUUAAGUACAGG	104	AAGCUCUAUUAAGUACAGG	104	CCUGUACUUAUAGAGCUU	842
CCUAUGGCAGGAAGAGCG	105	CCUAUGGCAGGAAGAGCG	105	CGCUUCCUCCUGCCAUAGG	843
AGGGGAAGUGACAUAGCAG	106	AGGGGAAGUGACAUAGCAG	106	CUGCUAUGUACAUUCCCU	844
UCCUAUGGCAGGAAGAGCG	107	UCCUAUGGCAGGAAGAGCG	107	GCUCUUCUCCUGCCAUAGG	845
CAGCAUUAUCAGAAGGAGC	108	CAGCAUUAUCAGAAGGAGC	108	GCUCUUCUGAUAAUGCUG	846
AUCUCCUAUUGGCAGGAAGA	109	AUCUCCUAUUGGCAGGAAGA	109	UCUUCUCCUGCCAUAGGAGU	847
AGCAGGAACUACUAGUACC	110	AGCAGGAACUACUAGUACC	110	GGUACUAGUAGUCCUGCU	848
GAAACCAAAUAGUAGGG	111	GAAACCAAAUAGUAGGG	111	CCCUAUAUUAUUGGUUUC	849
AAACCAAAUAGUAGGGG	112	AAACCAAAUAGUAGGGG	112	CCCUAUAUUAUUGGUUUC	850
CAGAAGGAGCCACCCACA	113	CAGAAGGAGCCACCCACA	113	UGUGGGGUGGCUCUUCUG	851
UAGCAGGAACUACUAGUAC	114	UAGCAGGAACUACUAGUAC	114	GUACUAGUAGUCCUGCUA	852
UGCAUGGACAAGUAGACUG	115	UGCAUGGACAAGUAGACUG	115	CAGUCUACUUGUCCAUAGCA	853
UAAGGCAUCUCCUAUGGCA	116	UAAGGCAUCUCCUAUGGCA	116	UGCCAUAGGAGAUCCUAA	854
UAUGGCAGGAAGAGCGGA	117	UAUGGCAGGAAGAGCGGA	117	UCCGUUCUCCUGCCAUAA	855
AUAGCAGGAACUACUAGUA	118	AUAGCAGGAACUACUAGUA	118	UACUAGUAGUCCUGCUAU	856
UAGACAUAAUAGCAACAGA	119	UAGACAUAAUAGCAACAGA	119	UCUGUUGCUAAUUAUGCUA	857
CAUUAUCAGAAGGAGCCAC	120	CAUUAUCAGAAGGAGCCAC	120	GUGGCUCCUUCUGAUAAUG	858
CUAUGGCAGGAAGAGCGG	121	CUAUGGCAGGAAGAGCGG	121	CCGUUCUCCUGCCAUAG	859
GAUAGGGGGAAUUGGAGGU	122	GAUAGGGGGAAUUGGAGGU	122	ACCUCCAAUCCCCUUAUC	860
ACAAUCCCAAAGUCAAGG	123	ACAAUCCCAAAGUCAAGG	123	CCUUGACUUUGGGGAUUGU	861
AUUCUUAACAAUCCCAA	124	AUUCUUAACAAUCCCAA	124	UUUGGGGAUUGUAGGGAU	862
AACCAAAUAGUAGGGGG	125	AACCAAAUAGUAGGGGG	125	CCCCUAUAUUUUGGUU	863
UCUCCUAUGGCAGGAAGAA	126	UCUCCUAUGGCAGGAAGAA	126	UUCUCCUGCCAUAGGAGA	864
CAUGCAUGGACAAGUAGAC	127	CAUGCAUGGACAAGUAGAC	127	GUACUACUUGUCCAUAGCA	865
CCUGUGUACCCACAGACCC	128	CCUGUGUACCCACAGACCC	128	GGGUCUGUGGGUACACAGG	866
CAUCAUAGGGAAGCUGCA	129	CAUCAUAGGGAAGCUGCA	129	UGCAGCUUCCCUAUAUGU	867
GACAUAGCAGGAACUACUA	130	GACAUAGCAGGAACUACUA	130	UAGUACUAGUAGUCCUGC	868
GAAAGGUGAAGGGGCGAGU	131	GAAAGGUGAAGGGGCGAGU	131	UACUGCCCUUCCACCUUUC	869
AGUGACAUAGCAGGAACUA	132	AGUGACAUAGCAGGAACUA	132	UAGUCCUGCUAUGUCACU	870
CGAGAUUAUACAGUAUUAU	133	CGAGAUUAUACAGUAUUAU	133	CUAAUACUGUAUACUCCG	871
GGAGCAGAUUAUACAGUAU	134	GGAGCAGAUUAUACAGUAU	134	AUACUGUAUACUUCGUCC	872
CCAAGGGGAAGUGACAUAG	135	CCAAGGGGAAGUGACAUAG	135	CUAUGUCACUCCCUUUGG	873
GAAGCUCUAUUAUAGUACAG	136	GAAGCUCUAUUAUAGUACAG	136	CUGUACUUAUAGAGCUUC	874
GGGAAGUGACAUAGCAGGA	137	GGGAAGUGACAUAGCAGGA	137	UCCUGCUAUGUCACUCC	875
CAUGCCUGUGUACCCACAG	138	CAUGCCUGUGUACCCACAG	138	CUGUGGGUACACAGGCAUG	876

GAAAGAGCAGAAGACAGUG	139	GAAAGAGCAGAAGACAGUG	139	CACUGUCUUCUGCUCUUC	877
ACAUAGCAGGAACUACUAG	140	ACAUAGCAGGAACUACUAG	140	CUAGUAGUUCUGCUAUGU	878
CAUCUCCUAGGCGAGGAAG	141	CAUCUCCUAGGCGAGGAAG	141	CUUCCUGCCUAGGAGAU	879
GAGCAGAUAGUACAGUAAU	142	GAGCAGAUAGUACAGUAAU	142	AAUACUGUUAUACUUGCUC	880
AGCAUUAUCAGAAGGAGCC	143	AGCAUUAUCAGAAGGAGCC	143	GGCUCUUCUGAUAAUGCU	881
CACCAGGCCAGAUAGAGA	144	CACCAGGCCAGAUAGAGA	144	UCUCUACUUGGCCUGGUG	882
GUGACAUAGCAGGAACUAC	145	GUGACAUAGCAGGAACUAC	145	GUAGUUCUGCUAUGUCAC	883
AGCAGGAAGAUUGCCAGUA	146	AGCAGGAAGAUUGCCAGUA	146	UACUGGCCAUUCUCCUGCU	884
GAGAACCAAGGGGAAGUGA	147	GAGAACCAAGGGGAAGUGA	147	UCACUUCUUGGUGUUCUC	885
AGUAGGGCAAGCAGGGAG	148	AGUAGGGCAAGCAGGGAG	148	CUUCCUGCUUGCCAUACU	886
CCUACAAUCCCAAGUCA	149	CCUACAAUCCCAAGUCA	149	UGACUUGGGGAUUGUAGG	887
CUACAAUCCCAAGUCA	150	CUACAAUCCCAAGUCA	150	UUGACUUGGGGAUUGUAG	888
GCCUGUACCCACAGACC	151	GCCUGUACCCACAGACC	151	GGUCUGUGGGUACACAGGC	889
AGCAGAUAGUACAGUAAU	152	AGCAGAUAGUACAGUAAU	152	UAAUACUGUUAUACUUGCU	890
AGAGAACCAAGGGGAAGUG	153	AGAGAACCAAGGGGAAGUG	153	CACUUCUUGGGGAUUGUAG	891
CCCACAAUCCCAAGUC	154	CCCACAAUCCCAAGUC	154	GACUUGGGGAUUGUAGGG	892
UGACAUAGCAGGAACUACU	155	UGACAUAGCAGGAACUACU	155	AGUAGUUCUGCUAUGUCA	893
UUUACAGAAGGAGCCACCC	156	UUUACAGAAGGAGCCACCC	156	GGUGUGCUCUUCUGAUA	894
AAGUGACAUAGCAGGAACU	157	AAGUGACAUAGCAGGAACU	157	AGUUCUGCUAUGUCACUU	895
GCAGGAAGAUUGGCCAGUAA	158	GCAGGAAGAUUGGCCAGUAA	158	UUACUGGCCAUUCUCCUGC	896
UAGGCAUCUCCUAGGCGAG	159	UAGGCAUCUCCUAGGCGAG	159	CUGCCAUAGGGAUUGCCUA	897
CAAGGGGAAGUGACAUAGC	160	CAAGGGGAAGUGACAUAGC	160	GCUAGUACAUUCUCCUUG	898
AAAGAGCAGAAGACAGUGG	161	AAAGAGCAGAAGACAGUGG	161	CCACUGUCUUCUGCUCUUU	899
CUCUUAUGGCAGGAAGAG	162	CUCUUAUGGCAGGAAGAG	162	CUUCUUCUGGCCAUAGGAG	900
UAUCAGAAGGAGCCACCCC	163	UAUCAGAAGGAGCCACCCC	163	GGGGUGGCUCUUCUGAUA	901
AUUUAUCAGAAGGAGCCACC	164	AUUUAUCAGAAGGAGCCACC	164	GGUGGCUUCUUCUGAUAU	902
AUGCCUGUGUACCCACAGA	165	AUGCCUGUGUACCCACAGA	165	UCUGUGGGGAUACACAGGCAU	903
AAUUAUGUAGAUUUCAGAG	166	AAUUAUGUAGAUUUCAGAG	166	CUCUGAAAUACUAAUUAU	904
UGCAUUAAGCAGCUGCUU	167	UGCAUUAAGCAGCUGCUU	167	AAGCAGCUGCUUUAUGCA	905
AAUUAUGUAGAUUUCAGAGA	168	AAUUAUGUAGAUUUCAGAGA	168	UCUCUGAAAUACUAAUUAU	906
GCAUCUCCUAGGCGAGGAA	169	GCAUCUCCUAGGCGAGGAA	169	UUCUGGCCAUAGGAUGUC	907
AGAACCAAGGGGAAGUGAC	170	AGAACCAAGGGGAAGUGAC	170	GUCACUUCUCCUUGGUCUC	908
UCAAAAUUUCGGGUUAU	171	UCAAAAUUUCGGGUUAU	171	AUAAACCGAAAAUUAUGA	909
CAGGGAUGGAAAGGAUAC	172	CAGGGAUGGAAAGGAUAC	172	GUGAUCCUUCUCCUCCUG	910
GAAGGAGCCACCCACAAG	173	GAAGGAGCCACCCACAAG	173	CUUGUGGGGUGGCUCUUC	911
AAUUUCGGGUUAUUAACA	174	AAUUUCGGGUUAUUAACA	174	UGUAAUAAACCGAAAAU	912

AGCAGGAAGCACAUGGGC	175	AGCAGGAAGCACAUGGGC	175	GCCCAUAGUGCUUCCUGCU	913
AUCAGAAGGAGCCACCCCA	176	AUCAGAAGGAGCCACCCCA	176	UGGGGUGGCUCUUCUGAU	914
UGAGAGAACCAAGGGGAAG	177	UGAGAGAACCAAGGGGAAG	177	CUUCCUUGGGUUCUCUA	915
AAGGUGAAGGGGCAGUAGU	178	AAGGUGAAGGGGCAGUAGU	178	ACUACUGCCCUUCCUUCU	916
GAAAAAUACAGUAAAGUA	179	GAAAAAUACAGUAAAGUA	179	UACUGUUAUGAUUUUUC	917
CAUUGAGGAAGCUGCAGAA	180	CAUUGAGGAAGCUGCAGAA	180	UUCUGCAGCUUCCUUAUG	918
AGAUGAUACAGUAAUAGAA	181	AGAUGAUACAGUAAUAGAA	181	UUCUAAUACUGUAUACU	919
UGAGGAAGCUGCAGAAUGG	182	UGAGGAAGCUGCAGAAUGG	182	CCAUUCUGCAGCUUCCUA	920
UAUUAUGACCCAUCAAAG	183	UAUUAUGACCCAUCAAAG	183	CUUUAUGGGGUAUAAUA	921
UCACUCUUGGCAACGACC	184	UCACUCUUGGCAACGACC	184	GGUCGUUGCCAAAGAGUGA	922
UGGAGAAAAUAGUAGAUU	185	UGGAGAAAAUAGUAGAUU	185	AAUCUACUAAUUCUCCA	923
AGACAGGAUGAGGAUUA	186	AGACAGGAUGAGGAUUA	186	UCUAAUCCUACUCCUGCU	924
AAAGGUGAAGGGGCAGUAG	187	AAAGGUGAAGGGGCAGUAG	187	CUACUGCCCUUCCAUUU	925
GGCAUCUCCUAGGCGAGGA	188	GGCAUCUCCUAGGCGAGGA	188	UCCUGCCAUAGGGAUGCC	926
AAGGAGCCACCCACAAGA	189	AAGGAGCCACCCACAAGA	189	UCUUGUGGGGUGGCUUCU	927
UAAAGCCAGGAUUGGAUGG	190	UAAAGCCAGGAUUGGAUGG	190	CCAUCCAUUCCUGGCUUA	928
GGAGAAAAUAGUAGAUUU	191	GGAGAAAAUAGUAGAUUU	191	AAAUACUAAUUCUCC	929
AAGAGCAGAAGACAGUGGC	192	AAGAGCAGAAGACAGUGGC	192	GCCACUGUCUUCUGCUCU	930
UCAGAAGGAGCCACCCAC	193	UCAGAAGGAGCCACCCAC	193	GUGGGUGGCUCUUCUGA	931
AGGCAUCUCCUAGGCGAGG	194	AGGCAUCUCCUAGGCGAGG	194	CGUGCCAUAGGAGUGCCU	932
AGGGAUGGAAAGGAUAC	195	AGGGAUGGAAAGGAUAC	195	GGUGAUCCUUCUCCUCCU	933
AGGAAGCUGCAGAAUGGGA	196	AGGAAGCUGCAGAAUGGGA	196	UCCCAUUGCAGCUCUCCU	934
CUGCAUUAAGCAGCUGCU	197	CUGCAUUAAGCAGCUGCU	197	AGCAGCUGCUUUAUAGCAG	935
AAGGGGCAGUAGUAAUACA	198	AAGGGGCAGUAGUAAUACA	198	UGUAAUACUACUCCCUU	936
UUGACUAGCGGAGGCUAGA	199	UUGACUAGCGGAGGCUAGA	199	UCUAGCCUCCGCUAGUCA	937
UAAAAGACACCAAGGAAGC	200	UAAAAGACACCAAGGAAGC	200	GCUUCCUUGGUGUUCUUA	938
GAGGAAGCUGCAGAAUGGG	201	GAGGAAGCUGCAGAAUGGG	201	CCCAUUCUGCAGCUUCCUC	939
CAGCAGGAAGCACAUGGG	202	CAGCAGGAAGCACAUGGG	202	CCCAUAGUGCUUCCUGCU	940
GGAGCCACCCACAAGAUU	203	GGAGCCACCCACAAGAUU	203	AAUCUUGGGGUGGCUCC	941
AUUUAUGACCCAUCAAAGA	204	AUUUAUGACCCAUCAAAGA	204	UCUUAUGUAGGGUUAUUA	942
CAGAUGAUACAGUAAUAGA	205	CAGAUGAUACAGUAAUAGA	205	UCUAAUACUGUAUACUG	943
AUGAGAGAACCAAGGGGA	206	AUGAGAGAACCAAGGGGA	206	UUCUCCUUGGUGUUCUUA	944
AUGAGGAAGCUGCAGAAUG	207	AUGAGGAAGCUGCAGAAUG	207	CAUUCUGCAGCUUCCUUA	945
UGCCUGUGUACCCACAGAC	208	UGCCUGUGUACCCACAGAC	208	GUUCUGGGUACACAGGCA	946
GAAGGGGCAGUAGUAAUAC	209	GAAGGGGCAGUAGUAAUAC	209	GUAAUACUACUGCCCUUC	947
UCAGCAUUAUCAGAAGGAG	210	UCAGCAUUAUCAGAAGGAG	210	CUCUUCUGUAUAGUGCUA	948

UUCAAAAUUUCGGGUUA	211	UUCAAAAUUUCGGGUUA	211	UAAACCCGAAAAUUUGAA	949
UCUGGAAAGGUGAAGGGGC	212	UCUGGAAAGGUGAAGGGGC	212	GCCCCUACACCUUCCAGA	950
UUAGCAGGAAGAUGGCCAG	213	UUAGCAGGAAGAUGGCCAG	213	CUGGGCAUUCUCCUGUAA	951
GAACCAAGGGGAAGUGACA	214	GAACCAAGGGGAAGUGACA	214	UGUCACUUCUCCUGGUUC	952
AGAAGGAGCCACCCACAA	215	AGAAGGAGCCACCCACAA	215	UUGUGGGGUGGCUCCUUC	953
AAUGAGGAAGCUGCAGAAU	216	AAUGAGGAAGCUGCAGAAU	216	AUUCUGCAGCUCCUUGAUU	954
AAGAAAAAUACAGUACAG	217	AAGAAAAAUACAGUACAG	217	CUGUACUGAUUUUUUUCU	955
GGAAUUGGAGGUUUUAUCA	218	GGAAUUGGAGGUUUUAUCA	218	UGAUAAAACCUCAAUUCC	956
UACAGUAUUAGUAGGACCU	219	UACAGUAUUAGUAGGACCU	219	AGGUCCUACUAAUACUGUA	957
CCAGGAUUGGAGGCCCAA	220	CCAGGAUUGGAGGCCCAA	220	UUGGGCCAUCCAUUCCUGG	958
UUCUAGUAGAUUGGGGCG	221	UUCUAGUAGAUUGGGGCG	221	CUGCCCCAUCAUAGAA	959
CAAAUUUUUCGGGUUUUAU	222	CAAAUUUUUCGGGUUUUAU	222	AAUAAACCCGAAAAUUUG	960
UAGACAGGAUGAGGAUUAG	223	UAGACAGGAUGAGGAUUAG	223	CUAAUCCUACUCCUGUCUA	961
UGACAGAAGAAAAAUAAA	224	UGACAGAAGAAAAAUAAA	224	UUUAUUUUUUCUUCUGUCA	962
UUUAUUACAGGGACAGCAG	225	UUUAUUACAGGGACAGCAG	225	CUGCUGUCCUGUAUAAA	963
GGGUUUUUACAGGGACAG	226	GGGUUUUUACAGGGACAG	226	CUGUCCUGUAUAAACCC	964
AGAUGGAACAAGCCCGAGA	227	AGAUGGAACAAGCCCGAGA	227	UCUGGGCUUGUCCCAUCU	965
CUAGCGGAGGCUAGAAGGA	228	CUAGCGGAGGCUAGAAGGA	228	UCCUUCUAGCCUCCGCUAG	966
UGACUAGCGGAGGCUAGAA	229	UGACUAGCGGAGGCUAGAA	229	UUCUAGCCUCCGCUAGUCA	967
GACAUAAUAGCAACAGACA	230	GACAUAAUAGCAACAGACA	230	UGUCUGUUGCUAUUAGUC	968
GGUUUUUUACAGGGACAGC	231	GGUUUUUUACAGGGACAGC	231	GCUGUCCUGUAUAAACC	969
GCAGGUGAUGAUUGUGUGG	232	GCAGGUGAUGAUUGUGUGG	232	CCACACAUCUACCCUGC	970
AUGGCAGGAAGAAGCGGAG	233	AUGGCAGGAAGAAGCGGAG	233	CUCCGCUUCUCCUGGCCAU	971
AGGUGAUGAUUGUGUGGCA	234	AGGUGAUGAUUGUGUGGCA	234	UGCCACACAUCUACCCU	972
CCACCCCAAGAUUUAAA	235	CCACCCCAAGAUUUAAA	235	UUUAAAUUUGUGGGGUGG	973
GUAAAAAUUGGAUGACAG	236	GUAAAAAUUGGAUGACAG	236	CUGUCAUCCAAUUUUUAC	974
AUAAUAGCAACAGACAUAC	237	AUAAUAGCAACAGACAUAC	237	GUUAGUCUGUUGCUAUUAU	975
GCAUUAAGCAGCUGCUUU	238	GCAUUAAGCAGCUGCUUU	238	AAAGCAGCUGCUUUAUUG	976
GGCAGGUGAUGAUUGUGUG	239	GGCAGGUGAUGAUUGUGUG	239	CACACAUCUACCCUGGCC	977
AUGAUACAGUAUUAGAAGA	240	AUGAUACAGUAUUAGAAGA	240	UCUUCUAAUCUGUAUUAU	978
GAUGGCAGGUGAUGAUUGU	241	GAUGGCAGGUGAUGAUUGU	241	ACAAUACUACCCUGCCAUC	979
CAUAAUAGCAACAGACAU	242	CAUAAUAGCAACAGACAU	242	UAUGUCUGUUGCUAUUAUG	980
AAAAUUUUUCGGGUUUUAU	243	AAAAUUUUUCGGGUUUUAU	243	UAAUAAACCCGAAAAUUU	981
ACAUAAUAGCAACAGACAU	244	ACAUAAUAGCAACAGACAU	244	AUGUCUGUUGCUAUUAUGU	982
AUUUCAAAAAUUGGGCCUG	245	AUUUCAAAAAUUGGGCCUG	245	CAGGCCCAUUUUUGAAAU	983
CUGGAAAGGUGAAGGGGCA	246	CUGGAAAGGUGAAGGGGCA	246	UGCCCCUACACCUUCCAG	984

AAAACAGAUGGCAGGUGAU	247	AAAACAGAUGGCAGGUGAU	247	AUCACCUGCCAUCUGUUUU	985
UUUCAAAAAUUGGGCCUGA	248	UUUCAAAAAUUGGGCCUGA	248	UCAGGCCCAUUUUUGAAA	986
GAGAGAACCAGGGGAAGU	249	GAGAGAACCAGGGGAAGU	249	ACUUCUCCUUGGUUCUCUC	987
CUCUGGAAAGGUGAAGGGG	250	CUCUGGAAAGGUGAAGGGG	250	CCCUUCACCUUCCAGAG	988
AUUAGCAGGAAGAUUGCCA	251	AUUAGCAGGAAGAUUGCCA	251	UGGCCAUUCCUGCUAAU	989
GAGCCACCCCAAGAUUUU	252	GAGCCACCCCAAGAUUUU	252	AAUUCUUGUGGGUGGCU	990
CAUAGCAGGAACUACUAGU	253	CAUAGCAGGAACUACUAGU	253	ACUAGUAGUCCUGCUAUG	991
UUUUAAAAGAAAAGGGGGG	254	UUUUAAAAGAAAAGGGGGG	254	CCCCCUUUUUUUUAAA	992
GCGGAGGCUAGAAGGAGAG	255	GCGGAGGCUAGAAGGAGAG	255	CUCUCUUCUAGCCUCCGC	993
CAGUAUUAGUAGGACCUAC	256	CAGUAUUAGUAGGACCUAC	256	GUAGGUCCUACUAAUACUG	994
AGGGGGAAUUGGAGGUUUU	257	AGGGGGAAUUGGAGGUUUU	257	AAAACCUCCAAUUCUCCU	995
ACAGUAUUAGUAGGACCUA	258	ACAGUAUUAGUAGGACCUA	258	UAGGUCCUACUAAUACUGU	996
GACUAGCGGAGGCUAGAAG	259	GACUAGCGGAGGCUAGAAG	259	CUUCUAGCCUCCGCUAGUC	997
GUUUUUUACAGGGACAGCA	260	GUUUUUUACAGGGACAGCA	260	UGCUGUCCUGUAUAAAC	998
CAGGUGAUGAUUGUGUGGC	261	CAGGUGAUGAUUGUGUGGC	261	GCCACACAUCUACCCUG	999
AGCGGAGGCUAGAAGGAGA	262	AGCGGAGGCUAGAAGGAGA	262	UCUCCUUCUAGCCUCCGCU	1000
UCUAGUAGAUUGGGGAGC	263	UCUAGUAGAUUGGGGAGC	263	GCUGUCCCAUCUACAUAGA	1001
UAAAAAUUGGAUGACAGA	264	UAAAAAUUGGAUGACAGA	264	UCUGUCAUCCAAUUUUUA	1002
GCAGCAGGAAGCACUAUGG	265	GCAGCAGGAAGCACUAUGG	265	CCAUGUGCUUCCUGGUG	1003
UUUUUACAGGGACAGCAGA	266	UUUUUACAGGGACAGCAGA	266	UCUGUGUCCUGUAUAA	1004
AAACAGAUGGCAGGUGAUG	267	AAACAGAUGGCAGGUGAUG	267	CAUCACCUGCCAUUCUGUU	1005
AUUCAAAAUUUCGGGUUUU	268	AUUCAAAAUUUCGGGUUUU	268	AAACCCGAAAAUUUGAAU	1006
GGGGAUUUGGAGGUUUUAU	269	GGGGAUUUGGAGGUUUUAU	269	AUAAACCCUCCAAUCCCC	1007
GCCACCCCAAGAUUUAA	270	GCCACCCCAAGAUUUAA	270	UUAAAUUUGUGGGUGGC	1008
GAUGAUACAGUAUUAGAAG	271	GAUGAUACAGUAUUAGAAG	271	CUUCUAAUACUGUAUAC	1009
UAUAGCAACAGACAUACA	272	UAUAGCAACAGACAUACA	272	UGUAUGUGUGUUGCUAUUA	1010
GAGGCUAGAAGGAGAGAGA	273	GAGGCUAGAAGGAGAGAGA	273	UCUCUCUCCUUCUAGCCUC	1011
GUACAGUAUUAGUAGGACC	274	GUACAGUAUUAGUAGGACC	274	GGUCCUACUAAUACUGUAC	1012
UAGCGGAGGCUAGAAGGAG	275	UAGCGGAGGCUAGAAGGAG	275	CUCCUUCUAGCCUCCGCUA	1013
CGGAGGCUAGAAGGAGAGA	276	CGGAGGCUAGAAGGAGAGA	276	UCUCUCUCCUUCUAGCCUCC	1014
GGUACAGUAUUAGUAGGAC	277	GGUACAGUAUUAGUAGGAC	277	GUCCUACUAAUACUGUACC	1015
AAUUUUUCGGGUUUUAUAC	278	AAUUUUUCGGGUUUUAUAC	278	GUAAUAAACCCGAAAAUUU	1016
AGCAGCAGGAAGCACUAUG	279	AGCAGCAGGAAGCACUAUG	279	CAUAGUGCUUCCUGGCUU	1017
AGCCACCCCAAGAUUUUA	280	AGCCACCCCAAGAUUUUA	280	UAAAUUUGUGGGUGGCU	1018
AACCAAGGGGAAGUGACAU	281	AACCAAGGGGAAGUGACAU	281	AUGUCACUCCCUUGGUU	1019
AAGGGGAAGUGACAUAGCA	282	AAGGGGAAGUGACAUAGCA	282	UGCUAUGUCACUCCCUU	1020



UUAAAGCCAGGAUUGGAUG	283	UUAAAGCCAGGAUUGGAUG	283	CAUCCAUUCCUGGCUUUA	1021
ACUAGCGGAGGCUAGAAGG	284	ACUAGCGGAGGCUAGAAGG	284	CCUUCUAGCCUCGCUAGU	1022
UAGGUACAGUAUUGUAGG	285	UAGGUACAGUAUUGUAGG	285	CCUACUAAUACUGUACCUA	1023
GGGGGAUUUGGAGGUUUUA	286	GGGGGAUUUGGAGGUUUUA	286	UAAAACCUCCAAUUCGCC	1024
AGAUGGCAGGUGAUUGAUUG	287	AGAUGGCAGGUGAUUGAUUG	287	CAAUCAUACCCUGCCAUUC	1025
UUAAACAAUGGCCAUUGAC	288	UUAAACAAUGGCCAUUGAC	288	GUCAUUGGCCAUUUGUUUA	1026
UGGCAGGUGAUUGUGUGU	289	UGGCAGGUGAUUGUGUGU	289	ACACAAUACUACCCUGCCA	1027
UAAAAUAGCAGGAAGAUG	290	UAAAAUAGCAGGAAGAUG	290	CAUCUCCUGCUAAUUUA	1028
AGGAGCCACCCACAGAAGU	291	AGGAGCCACCCACAGAAGU	291	AUCUUGUGGGUGGCUCCU	1029
GUUUUAGUAGGACCUACAC	292	GUUUUAGUAGGACCUACAC	292	GUUAGGUCCUACUAAUAC	1030
AAUCCCAAAGUCAAGGAG	293	AAUCCCAAAGUCAAGGAG	293	CUCUUGACUUUGGGGUAU	1031
CCAGGCCAGAUAGAGAGAAC	294	CCAGGCCAGAUAGAGAGAAC	294	GUUCUUCUACUUGGCCUG	1032
CCAUUGACAGAGAAAAA	295	CCAUUGACAGAGAAAAA	295	UUUUUUUUUUGUCAAUGG	1033
CAGAUUGCAGGUGAUUAU	296	CAGAUUGCAGGUGAUUAU	296	AAUCAUACCCUGCCAUUCG	1034
CAGAUAGAGAACCAAGGG	297	CAGAUAGAGAACCAAGGG	297	CCUUGGUUUCUUAUCUG	1035
GCCAUUGACAGAGAAAAA	298	GCCAUUGACAGAGAAAAA	298	UUUUUUUUUUGUCAAUGG	1036
UAUUAGUAGGACCUACACC	299	UAUUAGUAGGACCUACACC	299	GGUUGAGGUCCUACUAAUA	1037
UCUCGACGCGAGGACUGGC	300	UCUCGACGCGAGGACUGGC	300	GCCGAGUCCUGCGUCGAGA	1038
AGAUGAGAGAACCAAGGGG	301	AGAUGAGAGAACCAAGGGG	301	CCCCUUGGUUUCUCUACU	1039
AUCCCAAAGUCAAGGAGU	302	AUCCCAAAGUCAAGGAGU	302	ACUCCUUGACUUUGGGGAU	1040
AAUUAGCAGGAAGAUGGCC	303	AAUUAGCAGGAAGAUGGCC	303	GGCCAUUCCUGCUAAUUA	1041
GGGAUUUGGAGGUUUUAUC	304	GGGAUUUGGAGGUUUUAUC	304	GAUAAAACCUCAAUUCUCC	1042
CUCGACGCGAGGACUGGCU	305	CUCGACGCGAGGACUGGCU	305	AGCCGAGUCCUGCGUCGAG	1043
AUGGCCAUUGACAGAGAA	306	AUGGCCAUUGACAGAGAA	306	UUUUUUUUUUGUCAAUGG	1044
AAAAUUAGCAGGAAGAUGG	307	AAAAUUAGCAGGAAGAUGG	307	CCAUCUCCUGCUAAUUUA	1045
ACGCAGGACUCGGCUUGCU	308	ACGCAGGACUCGGCUUGCU	308	AGCAAGCCGAGUCCUGCGU	1046
UAAACAAGGCCAUUGACA	309	UAAACAAGGCCAUUGACA	309	UGUCAAUGGCCAUUUGUUA	1047
GAUGGAACAAGCCCCAGAA	310	GAUGGAACAAGCCCCAGAA	310	UUCUGGGGCUUUGUCCAU	1048
AAUGAACAGUAGAUAAU	311	AAUGAACAGUAGAUAAU	311	AUUUAUCUACUUGUUAU	1049
AUUGGAGGUUUUAUCAAAG	312	AUUGGAGGUUUUAUCAAAG	312	CUUUUGAUAAAACCUCCAU	1050
AGGCUAGAAGGAGAGAGAU	313	AGGCUAGAAGGAGAGAGAU	313	AUCUCUCUCCUUCUAGCCU	1051
AGAUGGGUGCGAGAGCGUC	314	AGAUGGGUGCGAGAGCGUC	314	GACGCUCCUCCGACCCAU	1052
AGGUACAGUAUUGUAGGA	315	AGGUACAGUAUUGUAGGA	315	UCCUACUAAUACUGUACCU	1053
GGAGGCUAGAAGGAGAGAG	316	GGAGGCUAGAAGGAGAGAG	316	CUCUCUCCUUCUAGCCUCC	1054
CAGGACAUACAAGGUAGG	317	CAGGACAUACAAGGUAGG	317	CCUACCUUGUUAUGUCCUG	1055
AGUAUUAGUAGGACCUACA	318	AGUAUUAGUAGGACCUACA	318	UGUAGGUCCUACUAAUACU	1056

UUGACAGAGAAAAAUAA	319	UUGACAGAGAAAAAUAA	319	UUUUUUUUUUCUUGUCAA	1057
UGGAGAAAGUAAUUAUUA	320	UGGAGAAAGUAAUUAUUA	320	UAUUAUUUACUUCUCCA	1058
CUCUCGACGCGAGGACUGCG	321	CUCUCGACGCGAGGACUGCG	321	CGGAGUCCUGCGUCGAGAG	1059
AUGAACAAAGUAAUAAU	322	AUGAACAAAGUAAUAAU	322	AAUUUAUCUACUUGUUAU	1060
UGGCCAUUGACAGAGAAA	323	UGGCCAUUGACAGAGAAA	323	UUUCUUCUGUCAAUGGCCA	1061
AUACCCAUUGUUUUCAGCAU	324	AUACCCAUUGUUUUCAGCAU	324	AUGCUGAAAACUUGGUUAU	1062
UUUAAAAGAAAGGGGGGA	325	UUUAAAAGAAAGGGGGGA	325	UCCCCCUUUUUUUUUAAA	1063
CGACGCGAGGACUCGGCUUG	326	CGACGCGAGGACUCGGCUUG	326	CAAGCCGAGUCCUGCGUCG	1064
AUUGACAGAGAAAAAUUA	327	AUUGACAGAGAAAAAUUA	327	UAUUUUUUUUCUUGUCAAU	1065
CUAGAAGGAGAGAGUUGG	328	CUAGAAGGAGAGAGUUGG	328	CCCAUCUCUCCUUCUUAAG	1066
UGGCAGGAAGAAGCGGAGA	329	UGGCAGGAAGAAGCGGAGA	329	UCUCCGCUUCUUCUUGCCA	1067
CAAUCCCCAAAGUCAAGGA	330	CAAUCCCCAAAGUCAAGGA	330	UCUUGACUUUGGGGAUUG	1068
AAAUUCAAUUUUUCGGGU	331	AAAUUCAAUUUUUCGGGU	331	ACCCGAAAAUUUUGAUUUU	1069
GAUUUGGAGGUUUUAUCAA	332	GAUUUGGAGGUUUUAUCAA	332	UUGAUAAAACCUCAAUUC	1070
GACGCGAGGACUCGGCUUG	333	GACGCGAGGACUCGGCUUG	333	GCAAGCCGAGUCCUGCGUC	1071
UUUGACUAGCGGAGGCUAG	334	UUUGACUAGCGGAGGCUAG	334	CUAGCCUCCGCUAGUCAA	1072
AUAGGUACAGUAUUGUAG	335	AUAGGUACAGUAUUGUAG	335	CUACUAAUACUUGUACCUAU	1073
GGCUAGAAGGAGAGAGAU	336	GGCUAGAAGGAGAGAGAU	336	CAUCUCUCUCCUUCUAGCC	1074
ACCAGGCCAGAUAGAGAA	337	ACCAGGCCAGAUAGAGAA	337	UUCUCUACUCUGGCCUGGU	1075
GAUGAGAGAACCAAGGGGA	338	GAUGAGAGAACCAAGGGGA	338	UCCCUUUUGGUUCUCUACU	1076
GGAGCAGCAGGAAGCACUA	339	GGAGCAGCAGGAAGCACUA	339	UAGUGCUUCCUGCGUCCU	1077
UCUCUCGACGCGAGGACUCG	340	UCUCUCGACGCGAGGACUCG	340	CGAGUCCUGCGUCGAGAGA	1078
UCCCUACAACUCCCAAAGU	341	UCCCUACAACUCCCAAAGU	341	ACUUUGGGGAUUGUAGGGA	1079
UUGGAGGUUUUAUCAAAGU	342	UUGGAGGUUUUAUCAAAGU	342	ACUUUGAUAAAACCUCAA	1080
ACUGUACAGUAAAAUUA	343	ACUGUACAGUAAAAUUA	343	UUAAUUUUUACUGGUACAGU	1081
AUGGCAGGUGAUUGUGUG	344	AUGGCAGGUGAUUGUGUG	344	CACAUAUACUCCUGGCCAU	1082
GAGGAAUUGAACAGUAGA	345	GAGGAAUUGAACAGUAGA	345	UCUACUUGUUAUUUCCUC	1083
AGACAUAAUAGCAACAGAC	346	AGACAUAAUAGCAACAGAC	346	GUCUGUUGCUAAUUAUGUCU	1084
AAAUUAGCAGGAAGAUGGC	347	AAAUUAGCAGGAAGAUGGC	347	GCCAUUUCCUGCUAAUUU	1085
UUUGGAGAAGUAAUUAU	348	UUUGGAGAAGUAAUUAU	348	AUAUAAUUAUACUCCCAA	1086
UCGACGCGAGGACUCGGCUU	349	UCGACGCGAGGACUCGGCUU	349	AAGCCGAGUCCUGCGUCGA	1087
AAAAUCAAUUUUUCGGG	350	AAAAUCAAUUUUUCGGG	350	CCCGAAAAUUUUGAAUUUU	1088
CAGGCCAGAUAGAGAACCC	351	CAGGCCAGAUAGAGAACCC	351	GGUUUCUCUACUUGGCCUG	1089
UACCCAUUUUUCAGCAUU	352	UACCCAUUUUUCAGCAUU	352	AAUGCUGAAAAUUGGGUA	1090
ACACAUGCCUGUGUACCCA	353	ACACAUGCCUGUGUACCCA	353	UGGUACACAGGCAUGUGU	1091
GGCCAUUGACAGAGAAAA	354	GGCCAUUGACAGAGAAAA	354	UUUUUUUUUUGUCAAUGGC	1092



GAGCAGCAGGAAGCACUAU	355	GAGCAGCAGGAAGCACUAU	355	AUAGUGCUUCCUGCUGCUC	1093
CUGUACCAGUAAAUAUAAA	356	CUGUACCAGUAAAUAUAAA	356	UUUAAAUAUACUGGUACAG	1094
GAAAUUGAUGACAGCAUGUC	357	GAAAUUGAUGACAGCAUGUC	357	GACAUUGCUGCAUUAUUC	1095
CAUUGACAGAAGAAAAAUU	358	CAUUGACAGAAGAAAAAUU	358	AUUUUUUCUUCUGUCAUUG	1096
AAUUGAUGACAGCAUGUCA	359	AAUUGAUGACAGCAUGUCA	359	UGACAUUGCUGCAUUAUUC	1097
GCUGAAGGAGAGAGAUUGG	360	GCUGAAGGAGAGAGAUUGG	360	CCAUUCUCUCCUUCUAGC	1098
UAGGGAUUAUGGAAAAACAG	361	UAGGGAUUAUGGAAAAACAG	361	CUGUUUUCCAUAAUCCCUA	1099
GAAAAUUAUGAUAUUCAG	362	GAAAAUUAUGAUAUUCAG	362	CUGAAAUUACUAUUAUUC	1100
CUACACCCUGUCAACAUAAU	363	CUACACCCUGUCAACAUAAU	363	AUUUAUUGACAGGUGUAG	1101
ACAGAUGGCAGGUGAUGAU	364	ACAGAUGGCAGGUGAUGAU	364	AUCAUACCCUGCCAUCUGU	1102
CCACAGGGAUGGAAAGGAU	365	CCACAGGGAUGGAAAGGAU	365	AUCCUUUCCAUCCUGUGG	1103
UUAGGGAUUAUGGAAAAACA	366	UUAGGGAUUAUGGAAAAACA	366	UGUUUUCCAUAAUCCCUAA	1104
AGAUGCUGCAUAUAAGCAG	367	AGAUGCUGCAUAUAAGCAG	367	CUGCUUAUAUGCAGCAUCU	1105
AAUAGCAACAGACAUACAA	368	AAUAGCAACAGACAUACAA	368	UUGUAUGUCUGUUGCUAUU	1106
AAUUCAAAAUUUCGGGUU	369	AAUUCAAAAUUUCGGGUU	369	AACCCGAAAAUUUUGAAUU	1107
CAGACUCACAAUAUGCAUU	370	CAGACUCACAAUAUGCAUU	370	AAUGCAUAUUGGAGUCUG	1108
UAUGCAUUAAGGAUUAUUC	371	UAUGCAUUAAGGAUUAUUC	371	GAAUGAUUCCUAUUGCAUA	1109
UACACCCUGUCAACAUAAU	372	UACACCCUGUCAACAUAAU	372	AAUUAUGUUGACAGGUGUA	1110
UGGAGGAAUUGAACAGUA	373	UGGAGGAAUUGAACAGUA	373	UACUUGUUAUUAUCCCUCA	1111
ACCAAGGGGAAGUGACAU	374	ACCAAGGGGAAGUGACAU	374	UAUGUCACUUCUUUUGGU	1112
GAGAUUGGUGCGAGAGCGU	375	GAGAUUGGUGCGAGAGCGU	375	ACGUCUCUGCAGCCCAUCUC	1113
UAUAGGUACAGUAUUAUGA	376	UAUAGGUACAGUAUUAUGA	376	UACUAAUACUGUACCUAAU	1114
AUUAGGGAUUAUGGAAAAAC	377	AUUAGGGAUUAUGGAAAAAC	377	GUUUUCCAUAAUCCCUAAU	1115
UGGCUGUGGAAAGAUACCU	378	UGGCUGUGGAAAGAUACCU	378	AGGUUAUUCUCCACAGCCA	1116
GAGAGAUUGGUGCGAGAGC	379	GAGAGAUUGGUGCGAGAGC	379	GCUCUCGCGACCCAUUCUC	1117
CCUACACCCUGUCAACAUAA	380	CCUACACCCUGUCAACAUAA	380	UUUAUGUUGACAGGUGUAGG	1118
CAGCAGUACAAUUGGCAGU	381	CAGCAGUACAAUUGGCAGU	381	ACUGCCAUUUGUACUGCUG	1119
GGCUGUGGAAAGAUACCUA	382	GGCUGUGGAAAGAUACCUA	382	UAGGUAUUCUUCACAGCC	1120
AGAAAAUUAUGAUAUUAU	383	AGAAAAUUAUGAUAUUAU	383	UGAAAAUCUACUAUUAUUCU	1121
GCCACCUUUGCCUAGUGUU	384	GCCACCUUUGCCUAGUGUU	384	AACACUAGGCAAGGUGGC	1122
GAUGCUGCAUAUAAGCAGC	385	GAUGCUGCAUAUAAGCAGC	385	GCUGCUUAUAUAGCAGCAUC	1123
GCUAUAGGUACAGUAUUAAG	386	GCUAUAGGUACAGUAUUAAG	386	CUAAUACUGUACCUUAUAGC	1124
AACAGAUUGCAGGUGAUGA	387	AACAGAUUGCAGGUGAUGA	387	UCAUACCCUGCCAUCUGUU	1125
AUCACUCUUGGCAACGAC	388	AUCACUCUUGGCAACGAC	388	GUCGUUGGCCAAAGAGUGAU	1126
ACAUGCCUGUGUACCCACA	389	ACAUGCCUGUGUACCCACA	389	UGUGGGUACACAGGCAUGU	1127
ACAGCAGUACAAUUGGCAG	390	ACAGCAGUACAAUUGGCAG	390	CUGCCAUUUGUACUGCUGU	1128

AUGCAUUAAGGAUUAUUA	391	AUGCAUUAAGGAUUAUUA	391	UGAAUGAUUCCUUAUUGCAU	1129
AAUUGGAGGUUUUAUCAA	392	AAUUGGAGGUUUUAUCAA	392	UUUGAUAAAACCUCCAAUU	1130
UUGGAGGAAAUUAACAAGU	393	UUGGAGGAAAUUAACAAGU	393	ACUUGUUAUUAUCCUCCAA	1131
AUUGGAGGAAAUUAACAAG	394	AUUGGAGGAAAUUAACAAG	394	CUUGUUAUUAUCCUCCAAU	1132
AAAAAUUAUUAUUAUUCGG	395	AAAAAUUAUUAUUAUUCGG	395	CCGAAAAUUUUGAAUUUUU	1133
AGGUGAAGGGGCGAGUAGU	396	AGGUGAAGGGGCGAGUAGU	396	UACUACUGCCCUUCCACCU	1134
CUAUAGGUACAGUAUUAUG	397	CUAUAGGUACAGUAUUAUG	397	ACUAAUACUGUACCUUAUAG	1135
AUUAAAGCCAGGAUUGGAU	398	AUUAAAGCCAGGAUUGGAU	398	AUCCAUUCCUGGCUUUAAU	1136
GGAGGAAUUGAACAGUAG	399	GGAGGAAUUGAACAGUAG	399	CUACUUGUUAUUAUCCUCC	1137
AGCAGUACAAUUGGCAGUA	400	AGCAGUACAAUUGGCAGUA	400	UACUGCCAUUUGUACUGCU	1138
AUCAGUACAAUUGGCAGUA	401	AUCAGUACAAUUGGCAGUA	401	GGAGGCAUUAUUGUACUAGU	1139
UAUUGGGUACCUUGUGGGA	402	UAUUGGGUACCUUGUGGGA	402	UACACACAGGUACCCCAUA	1140
AGAGAUUGGUGCGAGAGCG	403	AGAGAUUGGUGCGAGAGCG	403	CGCUCUCGCGACCCAUUCUC	1141
GGUGAAGGGGCGAGUAGUA	404	GGUGAAGGGGCGAGUAGUA	404	UUACUACUGCCCUUACACC	1142
GUGAAGGGGCGAGUAGUAU	405	GUGAAGGGGCGAGUAGUAU	405	AUUACUACUGCCCUUACAC	1143
CGCAGGACUCGGCUUGCUG	406	CGCAGGACUCGGCUUGCUG	406	CAGCAAGCCGAGUCCUGCG	1144
CACAUUGCCUGUGUACCCAC	407	CACAUUGCCUGUGUACCCAC	407	GUGGGUACACAGGCAUGUG	1145
GAGAGAGAUUGGUGCGAGA	408	GAGAGAGAUUGGUGCGAGA	408	UCUCGCGACCCAUUCUCUC	1146
UAGAAGGAGAGAGAUUGGU	409	UAGAAGGAGAGAGAUUGGU	409	ACCCAUUCUCUCCUUCUA	1147
CACAGGGAUGGAAAGGAUC	410	CACAGGGAUGGAAAGGAUC	410	GAUCCUUUCCAUCCUUGUG	1148
GGCAGGAAGAAAGCGGAGAC	411	GGCAGGAAGAAAGCGGAGAC	411	GUCUCCGCUUCUCCUUGCC	1149
UCCCAAAGUCAAGGAGUA	412	UCCCAAAGUCAAGGAGUA	412	UACUCCUUGACUUUGGGGA	1150
CCUGUCAACAUUAUUGGAA	413	CCUGUCAACAUUAUUGGAA	413	UUCCAAUUAUUGUAGAGG	1151
UAUCAGUACAAUUGGCUUC	414	UAUCAGUACAAUUGGCUUC	414	GAAGCACAUGUACUGGAU	1152
UGAAGGGGCGAGUAGUAU	415	UGAAGGGGCGAGUAGUAU	415	UAUUAUACUACUGCCCUUA	1153
CUCAGAUUGCUGCAUAUAAG	416	CUCAGAUUGCUGCAUAUAAG	416	CUUAUAUGCAGCAUCUGAG	1154
ACAGGGAUGGAAAGGAUCA	417	ACAGGGAUGGAAAGGAUCA	417	UGAUCCUUUCCAUCCUUGU	1155
AAGAAAAGGGGGGAUUGGG	418	AAGAAAAGGGGGGAUUGGG	418	CCCAUCCUCCCUUUUUCU	1156
UCAUUAAGGGAUUAUGGAA	419	UCAUUAAGGGAUUAUGGAA	419	UUUCCAUAAUCCCUAUA	1157
GAAGGAGAGAGAUUGGUGC	420	GAAGGAGAGAGAUUGGUGC	420	GCACCCAUUCUCCUCCUUC	1158
GUUAAACAAUUGGCAUUGA	421	GUUAAACAAUUGGCAUUGA	421	UCAUUGGCGCAUUGUUAAC	1159
AUGGACAAGUAGACUGUAG	422	AUGGACAAGUAGACUGUAG	422	CUACAGUCUACUUGUCCAU	1160
UAGUAGAUUUUCAGAGAACU	423	UAGUAGAUUUUCAGAGAACU	423	AGUUCUCUGAAUUAUUA	1161
CUGUCAACAUUAUUGGAAG	424	CUGUCAACAUUAUUGGAAG	424	CUUCCAAUUAUUGUACAG	1162
GGGGCAGUAGUAUUAACAAG	425	GGGGCAGUAGUAUUAACAAG	425	CUUGUAUUAUACUACGCCCC	1163
CAUUAAGGGAUUAUGGAAAA	426	CAUUAAGGGAUUAUGGAAAA	426	UUUUCCAUAAUCCCUAUG	1164

GAACUACUAGUACCCUUA	427	GAACUACUAGUACCCUUA	427	UGAAGGGUACUAGUAGUUC	1165
GCAGGAAGCACAUGGGCG	428	GCAGGAAGCACAUGGGCG	428	CGCCCAUAGUGCUUCCUG	1166
AAGGAGAGAGAUGGGUGCG	429	AAGGAGAGAGAUGGGUGCG	429	CGCACCACUUCUCUCCU	1167
CAGGAUUGGAUGGCCCAAA	430	CAGGAUUGGAUGGCCCAAA	430	UUUGGGCCAUCCAUUCCUG	1168
GGAAAUAGAACAAGUAGAU	431	GGAAAUAGAACAAGUAGAU	431	UAUCUACUUGUUCUUCU	1169
AAAAGACACCAAGGAAGCU	432	AAAAGACACCAAGGAAGCU	432	AGCUUCCUUGGUGUCUUU	1170
AUCAUUCAAGCACAACCAG	433	AUCAUUCAAGCACAACCAG	433	CUGGUUGUGCUUUGAUGAU	1171
AACAAGUAGAUAAAUUAGU	434	AACAAGUAGAUAAAUUAGU	434	ACUAAUUUAUCUACUUGU	1172
AGGAAUAGAACAAGUAGAU	435	AGGAAUAGAACAAGUAGAU	435	AUCUACUUGUUCUUCU	1173
GCAGGACUCGGCUUGCUGA	436	GCAGGACUCGGCUUGCUGA	436	UCAGCAAGCCGAGUCCUG	1174
GAUUAUUCAGCACAACC	437	GAUUAUUCAGCACAACC	437	GGUUGUGCUUGAUGAUUC	1175
CCUCAGAUUGCUGCAUUA	438	CCUCAGAUUGCUGCAUUA	438	UUAUUGCAGCAUCUGAGG	1176
GAUGGAAAGGAUACCCAGC	439	GAUGGAAAGGAUACCCAGC	439	GCUGGUGAUCCUUCUCC	1177
AGGAGAGAGAUGGGUGCGA	440	AGGAGAGAGAUGGGUGCGA	440	UCGCACCCAUUCUUCUCC	1178
CAUGGACAAGUAGACUGUA	441	CAUGGACAAGUAGACUGUA	441	UACAGUCUACUUGUCCAU	1179
UCAGAUUGCUGCAUUAAGC	442	UCAGAUUGCUGCAUUAAGC	442	GCUUAUUGCAGCAUCUGA	1180
AUGGAGAAAUUAGUAGAU	443	AUGGAGAAAUUAGUAGAU	443	AUCUACUAAUUUCUCCAU	1181
GAGAAAUUAGUAGAUUUC	444	GAGAAAUUAGUAGAUUUC	444	GAUUAUCUAAUUUCUCC	1182
AUGACAGCAUGUCAGGGAG	445	AUGACAGCAUGUCAGGGAG	445	AUCCUUGCAGCAUCUGU	1183
AGGCCAGAUAGAGAGAACCA	446	AGGCCAGAUAGAGAGAACCA	446	UGGUUUCUUCUUCUGGCC	1184
AGAGAGAUUGGUGCGAGAG	447	AGAGAGAUUGGUGCGAGAG	447	CUCUCGCACCCAUUCUCC	1185
ACCAUGUUAUUCAGCAUUA	448	ACCAUGUUAUUCAGCAUUA	448	UUAUGCUGAAACAUUGGG	1186
GAUGACAGCAUGUCAGGGGA	449	GAUGACAGCAUGUCAGGGGA	449	UCCUGAGCAUCUGUCCAU	1187
AGCCAGGAUUGGAUGGCC	450	AGCCAGGAUUGGAUGGCC	450	GGGCCAUCCAUUCCUGGCC	1188
UGAUGACAGCAUGUCAGGG	451	UGAUGACAGCAUGUCAGGG	451	CCUUGCAGUUGCUGUCCAU	1189
CAGGAAGCACAUGGGGCGC	452	CAGGAAGCACAUGGGGCGC	452	GCGCCCAUAGUGCUUCCUG	1190
ACAGACUCACAUAUUGCAU	453	ACAGACUCACAUAUUGCAU	453	AUGCAUAUUGGAGUCUGU	1191
UGGAGGUUUUAUCAAAGUA	454	UGGAGGUUUUAUCAAAGUA	454	UACUUUGAUAUAAACUCCA	1192
AAGCCAGGAUUGGAUGGCC	455	AAGCCAGGAUUGGAUGGCC	455	GGCCAUCCAUUCCUGGCCU	1193
UUUUGACUAGCGGAGGCUA	456	UUUUGACUAGCGGAGGCUA	456	UAGCCUCCGUAUGCAAAA	1194
CAGAUUGCUCAUAUAAGCA	457	CAGAUUGCUCAUAUAAGCA	457	UGCUUAUUGCAGCAUCUG	1195
UUGGGCCUGAAAUCCAUA	458	UUGGGCCUGAAAUCCAUA	458	UAUGGAUUUUCAGGCCCAA	1196
GCAUGGACAAGUAGACUGU	459	GCAUGGACAAGUAGACUGU	459	ACAGUCUACUUGUCCAU	1197
ACCUGUCAACAUAUUGGA	460	ACCUGUCAACAUAUUGGA	460	UCCAAUUAUUGUAGCAGGU	1198
CAGGAACUACUAGUACCCU	461	CAGGAACUACUAGUACCCU	461	AGGGUACUAGUAGUCCUG	1199
AUAGCAACAGACAUACAAA	462	AUAGCAACAGACAUACAAA	462	UUUGUAUGUCUGUUGCUAU	1200

GGAGAGAGAUGGGUGCGAG	463	GGAGAGAGAUGGGUGCGAG	463	CUCGCACCCAUUCUCUCC	1201
ACACCUUGCAACAUAUUG	464	ACACCUUGCAACAUAUUG	464	CAUUUAUUGUAGCAGGUGU	1202
AGAAAUAGUAGCAGCAUGU	465	AGAAAUAGUAGCAGCAUGU	465	ACAUGCUGUACUAAUUCU	1203
AGAAGGAGAGAGAUGGGUG	466	AGAAGGAGAGAGAUGGGUG	466	CACCCAUUCUCUCCUCCU	1204
AAUCAUUAAGCACAACCA	467	AAUCAUUAAGCACAACCA	467	UGGUUGUGCUUGAUAU	1205
CAAAAAUUGGGCCUGAAAA	468	CAAAAAUUGGGCCUGAAAA	468	UUUUCAGGCCCAUUUUUG	1206
GCAGUACAAUUGCAGUAU	469	GCAGUACAAUUGCAGUAU	469	AUUGCCCAUUUGUACUGC	1207
GGGCAGUAGUAUACAAGA	470	GGGCAGUAGUAUACAAGA	470	UCUUGUAUUAUACUUGCC	1208
UCAUUAAGCACAACCCAG	471	UCAUUAAGCACAACCCAG	471	UCUGGUUGUGCUUGAUAU	1209
AUGAUGACAGCAUGUCAGG	472	AUGAUGACAGCAUGUCAGG	472	CCUGACAGCUGUACUACAU	1210
GAACAAGUAGUAUUAUAG	473	GAACAAGUAGUAUUAUAG	473	CUAAUUUAUACUUGUUC	1211
UGACAGCAUGUCAGGGAGU	474	UGACAGCAUGUCAGGGAGU	474	ACUCCUGACAGUUGCUUA	1212
GGAAUACUAGUACCCUUC	475	GGAAUACUAGUACCCUUC	475	GAGGGUACUAGUAGUCC	1213
CACCUUGCAACAUAUUGG	476	CACCUUGCAACAUAUUGG	476	CCAAUUUAUUGUACAGGUC	1214
GGCCAGAUAGAGAGAACCA	477	GGCCAGAUAGAGAGAACCA	477	UUGGUUCUCUACUUGGCC	1215
UGUGUACCCACAGACCCCA	478	UGUGUACCCACAGACCCCA	478	UGGGGUGUGUGGGUACACA	1216
GGAAUCAUUAAGCACAAC	479	GGAAUCAUUAAGCACAAC	479	GUUGUGCUUGAUAUUC	1217
CAGUACAAUUGGCAGUAU	480	CAGUACAAUUGGCAGUAU	480	AAUACUGCCAUUUGUACUG	1218
GCAGGAAGAGCGGAGACA	481	GCAGGAAGAGCGGAGACA	481	UGUCUCCGCUUCUCCUGC	1219
AAAGCCAGGAUUGGAGGCG	482	AAAGCCAGGAUUGGAGGCG	482	GCCAUCCAUUCCUGGCCUU	1220
UGAAACAAGUAGUAUUAU	483	UGAAACAAGUAGUAUUAU	483	UAAUUUAUACUUGUUA	1221
CAAAAAUUCAAAAUUUCG	484	CAAAAAUUCAAAAUUUCG	484	CGAAAAUUUGAAUUUUG	1222
UAGGACCUACACCUUGUCAA	485	UAGGACCUACACCUUGUCAA	485	UUAGACAGGUGUAGGUCCU	1223
GCCAGAUAGAGAGAACCAAG	486	GCCAGAUAGAGAGAACCAAG	486	CUUGGUUCUCUACUUGGC	1224
GACAGCUGGACUGUCAUUG	487	GACAGCUGGACUGUCAUUG	487	CAUUGACAGUCCAGCUGUC	1225
AAAGCCACCUUUGCCUAGU	488	AAAGCCACCUUUGCCUAGU	488	ACUAGGCAAGGGUGGCCUU	1226
GAAUUGAACAAGUAGUAU	489	GAAUUGAACAAGUAGUAU	489	UUAUCUACUUGUACUUC	1227
ACAAUUUUAAGAAAGG	490	ACAAUUUUAAGAAAGG	490	CCUUUUCUUUUAUUUGU	1228
GCUGUGGAAAGAUACCUAA	491	GCUGUGGAAAGAUACCUAA	491	UUAAGGUACUUUCCACAGC	1229
UGUCAACAUAUUGGAAGA	492	UGUCAACAUAUUGGAAGA	492	UCUUCCCAUUUAGUUGACA	1230
UAAAGAAAAAGGGGGAUU	493	UAAAGAAAAAGGGGGAUU	493	AAUCCCCUUUUCUUUA	1231
CAUUUUUUAAGAAAGGGG	494	CAUUUUUUAAGAAAGGGG	494	CCUUUUUCUUUUAAAAUUG	1232
UUAGUAGAUUUCAGGAAC	495	UUAGUAGAUUUCAGGAAC	495	GUUCUCUGAAACUACUAA	1233
AAUUUUUUAAGAAAGGGG	496	AAUUUUUUAAGAAAGGGG	496	CCUUUUUCUUUUAAAAU	1234
UAGCAACAGACAUACAAAC	497	UAGCAACAGACAUACAAAC	497	GUUUGUAGUCUGUUGCUA	1235
UGGAACAAGCCCCAGAGA	498	UGGAACAAGCCCCAGAGA	498	UCUUCUGGGCUUGUCCA	1236

AGGAUGAGGAUUGAACAU	499	AGGAUGAGGAUUGAACAU	499	AUGUUCUAAUCCUCAUCCU	1237
GACAAUUGGAGAAGUGAAU	500	GACAAUUGGAGAAGUGAAU	500	AUUCACUUCUCCAAUUGUC	1238
ACAGACCCCAACCCACAAG	501	ACAGACCCCAACCCACAAG	501	CUUGUGGGUUGGGGUCUGU	1239
CACCUAGAACUUAUAAUUGC	502	CACCUAGAACUUAUAAUUGC	502	GCAUUAUAAAGUUCUAGGUG	1240
GAGCCAAACAGCCCAACAG	503	GAGCCAAACAGCCCAACAG	503	CUGGUGGGGUCUGUUGGUC	1241
AGGACCUACACCUUGUCAAC	504	AGGACCUACACCUUGUCAAC	504	GUUAGCAGGUGUAGGUCCU	1242
UUACAAAAUUCAAAAUUU	505	UUACAAAAUUCAAAAUUU	505	AAAUUUUGAAUUUUUGUAA	1243
GGAGGUUUUAUCAAAGUAA	506	GGAGGUUUUAUCAAAGUAA	506	UUACUUUGAAUAAACUCC	1244
CUGGCUUGGAAAGAUACC	507	CUGGCUUGGAAAGAUACC	507	GGUUAUUCUCCACAGCCAG	1245
GGAGAAGUGAAUUAUUA	508	GGAGAAGUGAAUUAUUA	508	UUUAUAAUUCACUUCUCC	1246
AAUGAUGACAGCAUGUCAG	509	AAUGAUGACAGCAUGUCAG	509	CUGACAUUGCUCAUUAUU	1247
AUCAUUAAGGGAUUAUGGAA	510	AUCAUUAAGGGAUUAUGGAA	510	UUCCAUUAUCCCUAAUGAU	1248
UCAAUUUUGGGCCUGAAA	511	UCAAUUUUGGGCCUGAAA	511	UUUCAGGCCCAUUUUUGA	1249
ACCUACACCUUGUCAACAU	512	ACCUACACCUUGUCAACAU	512	UAUGUUUGACAGGUGUAGGU	1250
GAUGAGGAUUAAGAACAU	513	GAUGAGGAUUAAGAACAU	513	CCAUGUUCUAAUCCUCAUC	1251
ACAGCUGGACUGUCAUUA	514	ACAGCUGGACUGUCAUUA	514	UCAUUGACAGUCCAGCUGU	1252
CCUCACAGAUUGCUGCAUUA	515	CCUCACAGAUUGCUGCAUUA	515	UAUAUGCAGCAUCUGAGGG	1253
AUUAGUAGAUUUCAGAGAA	516	AUUAGUAGAUUUCAGAGAA	516	UUCUCUGAAAUUACUUAU	1254
AGAAAGAGCAGAGACAGU	517	AGAAAGAGCAGAGACAGU	517	ACUGUCUUCUGCUCUUUCU	1255
GACCUACACCUUGUCAACAU	518	GACCUACACCUUGUCAACAU	518	AUGUUUGACAGGUGUAGGUC	1256
CACUCUUUGGCAACGACCC	519	CACUCUUUGGCAACGACCC	519	GGGUCUGUUGCAAAGAGUG	1257
AUGAGGAUUAAGAACAU	520	AUGAGGAUUAAGAACAU	520	UCCAUUGUCAAUCCUCAU	1258
AUUUUAAAGAAAAGGGGG	521	AUUUUAAAGAAAAGGGGG	521	CCCCUUUUUUUUUUUUUU	1259
AGAACUUUAAUUGCAUGGG	522	AGAACUUUAAUUGCAUGGG	522	CCCAUGCAUUUAAAGUUCU	1260
AUCUAUCAUACAUGGAUG	523	AUCUAUCAUACAUGGAUG	523	CAUCCAUGUAUUGAUAGAU	1261
AUGGAACAAGCCCAGAAG	524	AUGGAACAAGCCCAGAAG	524	CUUCUGGGGCUUGUCCAU	1262
UUUAGACCAUCAAAGAC	525	UUUAGACCAUCAAAGAC	525	GUUUUUUGAUGGGUCAAUA	1263
CACAAUUUUAAAGAAAG	526	CACAAUUUUAAAGAAAG	526	CUUUUUUUUUUUUUUUUG	1264
GAACUUUUAAUUGCAUGGGU	527	GAACUUUUAAUUGCAUGGGU	527	ACCAUGCAUUUAAAGUUC	1265
AAAGAAAAGGGGGGAUUG	528	AAAGAAAAGGGGGGAUUG	528	CAUUGCCCCUUUUUUUUUU	1266
GGUAGGAAAGGAUACACAG	529	GGUAGGAAAGGAUACACAG	529	CUGGUAUGCCUUUCCAUCC	1267
AGGGGCAGUAGUAAUACAA	530	AGGGGCAGUAGUAAUACAA	530	UUGUAUUUACUACUCCCUU	1268
AAAGGGGGGAUUGGGGGGU	531	AAAGGGGGGAUUGGGGGGU	531	ACCCCCCAUCCCCCUUUU	1269
AAGGGGGGAUUGGGGGGUA	532	AAGGGGGGAUUGGGGGGUA	532	UACCCCCCAUCCCCCUUU	1270
CAGGAUGAGGAUUAAGACA	533	CAGGAUGAGGAUUAAGACA	533	UGUUCUAAUCCUCAUCCUG	1271
AAAAUAGUAGAUUUCAGA	534	AAAAUAGUAGAUUUCAGA	534	UCUGAAUUCUACUAAUUU	1272

GAAUUGGAGGAAUUGAAC	535	GAAUUGGAGGAAUUGAAC	535	UGUUCAUUUCCUCCAAUUC	1273
UACAAAAUUCAAAAUUU	536	UACAAAAUUCAAAAUUU	536	AAAAUUUUGAAUUAUUGUA	1274
AGGAACUACUAGUACCCUU	537	AGGAACUACUAGUACCCUU	537	AAGGGUACUAGUAGUCCU	1275
AAAGAAAAGGGGGGAUUG	538	AAAGAAAAGGGGGGAUUG	538	CCAAUCCCCCUUUUUUUU	1276
AAAAUUGGAGUACAGAAA	539	AAAAUUGGAGUACAGAAA	539	UUUUCUACUCCAAUUUUU	1277
ACAGGAUGAGGAUUAAGAC	540	ACAGGAUGAGGAUUAAGAC	540	GUUCUAAUCCUCAUCCUGU	1278
ACAAUUGGAGAAGUGAAUU	541	ACAAUUGGAGAAGUGAAUU	541	AAUUCACUUCUCCAAUUGU	1279
GGUAGGGAUUAAGAACAU	542	GGUAGGGAUUAAGAACAU	542	CAUGUUCUAAUCCUCCAU	1280
UCACCUAGAACUUUAAUUG	543	UCACCUAGAACUUUAAUUG	543	CAUUUAAAGUUCUAGGUGA	1281
AUUGGGCCUGAAAAUCCAU	544	AUUGGGCCUGAAAAUCCAU	544	AUGGAUUUUCAGGCCCAU	1282
AAUUGGGCCUGAAAAUCCA	545	AAUUGGGCCUGAAAAUCCA	545	UGGAUUUUCAGGCCCAU	1283
GGACCUACACCUUGUCAACA	546	GGACCUACACCUUGUCAACA	546	UGUUGACAGGUGUAGGUCC	1284
GACAGGAUGAGGAUUAAGAA	547	GACAGGAUGAGGAUUAAGAA	547	UUCUAAUCCUCAUCCUGU	1285
UCUAUCAUACAUGGAUGA	548	UCUAUCAUACAUGGAUGA	548	UCAUCCAUUGUAGUAGUA	1286
GGAAUUGGAGGAAUUGAAC	549	GGAAUUGGAGGAAUUGAAC	549	GUUCAUUUCCUCCAAUCC	1287
AAAAGGGGGGAUUGGGGGG	550	AAAAGGGGGGAUUGGGGGG	550	CCCCCAUCCCCCUUUUU	1288
AAAAUUGGAUGACAGAAAC	551	AAAAUUGGAUGACAGAAAC	551	GUUUUGUACUCCAAUUUU	1289
CAAUUGGAGAAGUGAAUU	552	CAAUUGGAGAAGUGAAUU	552	UAUUUACUUCUCCAAUUG	1290
AUGACCCAUCAAAGACUU	553	AUGACCCAUCAAAGACUU	553	AAGUCUUUUGAUGGGUUAU	1291
CUUAAGCCUCAAUAAAGCU	554	CUUAAGCCUCAAUAAAGCU	554	AGCUUUUUGAGGCUUAAAG	1292
AGUACAAUGUCUCCACA	555	AGUACAAUGUCUCCACA	555	UGUGAAGCAUUAUUGUACU	1293
UUUCCGUGGGGACUUUCC	556	UUUCCGUGGGGACUUUCC	556	GGAAAGUCCCAAGCGGAA	1294
CAGACAUCAAACUAAAGA	557	CAGACAUCAAACUAAAGA	557	UCUUUAGUUUGUAGUCUG	1295
UUUAGCCUCAAUAAAGCU	558	UUUAGCCUCAAUAAAGCU	558	AAGCUUUUUGAGGCUUAA	1296
GGACAAUUGGAGAAUGUAA	559	GGACAAUUGGAGAAUGUAA	559	UUCACUUCUCCAAUUGUCC	1297
GGAUUGGGGGUACAGUGC	560	GGAUUGGGGGUACAGUGC	560	GCACUGUACCCCAUCC	1298
AAUUGGGCCUGAAAAUCC	561	AAUUGGGCCUGAAAAUCC	561	GGAUUUUUCAGGCCCAUUU	1299
GGGGGAUUGGGGGUACAG	562	GGGGGAUUGGGGGUACAG	562	CUGUACCCCAUCCUCC	1300
GUGGGGGGACUAAAGCAG	563	GUGGGGGGACUAAAGCAG	563	CUGCUUGAUGUCCCCAC	1301
UCCUGGCUGUGGAAAGUA	564	UCCUGGCUGUGGAAAGUA	564	UAUCUUUCCACAGCCAGGA	1302
ACAAAAUUCAAAAUUUUC	565	ACAAAAUUCAAAAUUUUC	565	GAAAAUUUGAAUUUUUGU	1303
GGGGAUUGGGGGUACAGU	566	GGGGAUUGGGGGUACAGU	566	ACUGUACCCCAUCCUCC	1304
UAAACACAGUGGGGGGACA	567	UAAACACAGUGGGGGGACA	567	UGUCCCCCAUUGUUAU	1305
CAGACCCCAACCAAGAA	568	CAGACCCCAACCAAGAA	568	UCUUUGGGGUUGGGGUCG	1306
AGGGGCAAUUGGUACAUA	569	AGGGGCAAUUGGUACAUA	569	UGAUGUACCAUUGCCCUU	1307
AAUUGGAGGAAUUGAACAA	570	AAUUGGAGGAAUUGAACAA	570	UUGUUCAUUUCCUCCAAU	1308

【0375】

AAGCCACCUUUGCCUAGUG	571	AAGCCACCUUUGCCUAGUG	571	CACUAGGCAAAGGUGGCUU	1309
CCAUGUUUUCAGCAUUAUC	572	CCAUGUUUUCAGCAUUAUC	572	GAUAAUGCUGAAAACAUUG	1310
AAAGAAAAAUCAGUAAAC	573	AAAGAAAAAUCAGUAAAC	573	UGUUACUGAUUUUUUCUUU	1311
AAAAAAUUGGAUGACAGAA	574	AAAAAAUUGGAUGACAGAA	574	UUCUGCAUCCAAUJUUUU	1312
CAGUACAAGUGGCUUCCAC	575	CAGUACAAGUGGCUUCCAC	575	GUGGAAGCACAUGUACUG	1313
CUUUCCGCGUGGGGACUUUC	576	CUUUCCGCGUGGGGACUUUC	576	GAAAGUCCCCAGCGGAAAG	1314
GCAACAGACAUACAACUA	577	GCAACAGACAUACAACUA	577	UAGUUUGAUUGUCUGUUGC	1315
UAUCACCUAGAACUUUAAA	578	UAUCACCUAGAACUUUAAA	578	UUUAAAGUUCUAGGUGAUA	1316
ACCCACAGACCCCAAGCCA	579	ACCCACAGACCCCAAGCCA	579	UGGGUUGGGGUCUGUGGU	1317
GAUAGAUUGGAACAAGCCCC	580	GAUAGAUUGGAACAAGCCCC	580	GGGGCUUGUUCACUUAUC	1318
GCUUAAGCCUCAUAAAGC	581	GCUUAAGCCUCAUAAAGC	581	GCUUUAUUGAGGCUUAAAGC	1319
AUUGGGGGGUACAGUGCAG	582	AUUGGGGGGUACAGUGCAG	582	CUGCAGUGUACCCCCAAU	1320
CCCACAGACCCCAACCCAC	583	CCCACAGACCCCAACCCAC	583	GUGGGUUGGGGUCUGUGGG	1321
AAAAUUGGGCCUGAAAAUC	584	AAAAUUGGGCCUGAAAAUC	584	GAUUUUCAGGCCAAUUUU	1322
CAUUCAGCACACCCAGAU	585	CAUUCAGCACACCCAGAU	585	AUCUGGUUGGCUUGAAUG	1323
ACUUUAAUUGCAUGGGUAA	586	ACUUUAAUUGCAUGGGUAA	586	UUACCCAUUGCAUUUAAAGU	1324
UAGAACUUUAAUUGCAUGG	587	UAGAACUUUAAUUGCAUGG	587	CCAUUGCAUUUAAAGUUCUA	1325
CUUUAAUUGCAUGGGUAAA	588	CUUUAAUUGCAUGGGUAAA	588	UUUACCAUGCAUUUAAAGU	1326
GGGAUUGGGGGGUACAGUG	589	GGGAUUGGGGGGUACAGUG	589	CACUGUACCCCCAAUCCG	1327
UAUGACCCAUCAAAAGACU	590	UAUGACCCAUCAAAAGACU	590	AGUCUUUUGAUUGGGUCAUA	1328
GAAGAAGCGGAGACAGCGA	591	GAAGAAGCGGAGACAGCGA	591	UCGCGUUGCCCGCUUCUUC	1329
CCCAUGUUUUCAGCAUUAU	592	CCCAUGUUUUCAGCAUUAU	592	AUAUUGCUGAAAAACUUGG	1330
AGGAUUGGAGGAAUUGAA	593	AGGAUUGGAGGAAUUGAA	593	UUCAUUUCCUCCAAUCCU	1331
AGAGACAGGCUAAUUUUUU	594	AGAGACAGGCUAAUUUUUU	594	AAAAUUUAGCCUGUCUCU	1332
AAGUAGAUAAUUAUGUCAG	595	AAGUAGAUAAUUAUGUCAG	595	CUGACUAAUUUAUCUACUU	1333
AUGUUUUCAGCAUUAUCAG	596	AUGUUUUCAGCAUUAUCAG	596	CUGAUAAUGCUGAAACAU	1334
UUUUGUCUGGUUAUGUGC	597	UUUUGUCUGGUUAUGUGC	597	GCACUUAACAGACAUAUA	1335
AUUACAAAAUUCAAAAUU	598	AUUACAAAAUUCAAAAUU	598	AAUUUUGAAUUUUUGAAU	1336
GCCAGGAUUGGAUGGCCCA	599	GCCAGGAUUGGAUGGCCCA	599	UGGGCAUCCAUUCUGGC	1337
CCUGGCUUGGAAAGAUAC	600	CCUGGCUUGGAAAGAUAC	600	GUUUCUUUCCAGCCAGCG	1338
UGUUUUCAGCAUUAUCAGA	601	UGUUUUCAGCAUUAUCAGA	601	UCUGAUAAUGCUGAAAAACA	1339
ACCUAGAACUUUAAUUGCA	602	ACCUAGAACUUUAAUUGCA	602	UGCAUUUAAAGUUCUAGGU	1340
GGGAUGGAAAGGAUACCCA	603	GGGAUGGAAAGGAUACCCA	603	UGGUGAUCCUUUCCAUCCC	1341
AAUUAAGCCAGGAUUGGA	604	AAUUAAGCCAGGAUUGGA	604	UCCAUUCCUGGCUUUUAUU	1342
AAAGGAUUGGAGGAAUUG	605	AAAGGAUUGGAGGAAUUG	605	CAUUUCCUCCAAUUCUUU	1343
ACUUUCCGCGUGGGGACUUU	606	ACUUUCCGCGUGGGGACUUU	606	AAAGUCCCCAGCGGAAAGU	1344

【表24】

(109)

JP 2006-502694 A 2006.1.26

40

30

20

10

【0376】

ACAGAAGAAAAUAAAG	607	ACAGAAGAAAAUAAAG	607	CUUUUUAUUUUUCUUCUGU	1345
AGCAACAGACAUACAACU	608	AGCAACAGACAUACAACU	608	AGUUUUGUAUGUCUGUUGCU	1346
UAUUGUCUGGUUAUGUGCA	609	UAUUGUCUGGUUAUGUGCA	609	UGCACUUAUACAGACAUAU	1347
UUAAAAAGAAAGGGGGGAU	610	UUAAAAAGAAAGGGGGGAU	610	AUCCCCCUUUUCUUUUA	1348
UGCUUUAAGCCUCAUAAAG	611	UGCUUUAAGCCUCAUAAAG	611	CUUUUAUGAGGCUUAAAGCA	1349
CAGGAAGAUUGGCCAGUAAA	612	CAGGAAGAUUGGCCAGUAAA	612	UUUACUUGGCCAUUCUUGG	1350
CCAGAUAGAGAAACCAAGG	613	CCAGAUAGAGAAACCAAGG	613	CCUUGGUUCUCUACUUGG	1351
GAUUGGGGGGUACAGUGCA	614	GAUUGGGGGGUACAGUGCA	614	UGCACUGUACCCCCCAUUC	1352
AAUUGAAACAAGUAGUAAA	615	AAUUGAAACAAGUAGUAAA	615	UUUUAUCUAGUUGUUCUUU	1353
AGCCACCUUUGCCUAGUGU	616	AGCCACCUUUGCCUAGUGU	616	ACACUAGGCAAAAGGUGGU	1354
GACUUUCCGCGUGGGGACUU	617	GACUUUCCGCGUGGGGACUU	617	AAGUCCCCAGCGGAAAGUC	1355
CCAGUAAAAUUAAGCCAG	618	CCAGUAAAAUUAAGCCAG	618	CUGGCUUUAAUUUACUGG	1356
GCAUUGUAUGGCCUCCCA	619	GCAUUGUAUGGCCUCCCA	619	UGGGAGGGGCAUACAUUGC	1357
AACUUUAAUUGCAUGGGUA	620	AACUUUAAUUGCAUGGGUA	620	UACCCAUAGCAUUUAAAGUU	1358
UUGGGGGGUACAGUGCAGG	621	UUGGGGGGUACAGUGCAGG	621	CCUGCAGUGUACCCCCCA	1359
GGACUUUCCGCGUGGGGACU	622	GGACUUUCCGCGUGGGGACU	622	AGUCCCCAGCGGAAAGUCC	1360
CUAGAACUUUAAUUGCAUG	623	CUAGAACUUUAAUUGCAUG	623	CAUGCAUUUAAAGUUCUAG	1361
UCAGUACAAGUGGCUUCCA	624	UCAGUACAAGUGGCUUCCA	624	UGGAAGCACAUGUACUGA	1362
AAGGAUUUGGAGGAAUUGA	625	AAGGAUUUGGAGGAAUUGA	625	UCAUUUCCUCCAAUUCUU	1363
UACCCACAGACCCCAACCC	626	UACCCACAGACCCCAACCC	626	GGGUUGGGGUCUGUGGGUA	1364
GAGACAGGCUAAUUUUUUA	627	GAGACAGGCUAAUUUUUUA	627	UAAAAAUUAGCCUGUCUC	1365
UCGCUUAAAGCCUCAUAAA	628	UCGCUUAAAGCCUCAUAAA	628	UUUUAUUGAGGCUUAAAGCAG	1366
AGGAAGAUUGGCCAGUAAA	629	AGGAAGAUUGGCCAGUAAA	629	UUUUACUGGCCAUUCUCCU	1367
AGACAUACAACUAAAGAA	630	AGACAUACAACUAAAGAA	630	UUCUUUAGUUUGUUAUGUCU	1368
CAUGUUUUCAGCAUUAUCA	631	CAUGUUUUCAGCAUUAUCA	631	UGAUAAUUGCUGAAACAUUG	1369
UUGGAAAGGACCGCAAG	632	UUGGAAAGGACCGCAAG	632	CUUUGCUGGUCCUUUCCAA	1370
GGCUGUUGGAAUUGUGGAA	633	GGCUGUUGGAAUUGUGGAA	633	UUCACAAUUUCCAAACAGCC	1371
UAAAUUGGAGAAAAUAGUA	634	UAAAUUGGAGAAAAUAGUA	634	UACUAAUUUUUCUCCAUUA	1372
AGGAAGAAAGCGGAGACAGC	635	AGGAAGAAAGCGGAGACAGC	635	GCUGUCUCCGCUUCUCCU	1373
AAAAAAGAAAAUUCAGUA	636	AAAAAAGAAAAUUCAGUA	636	UACUGAUUUUUUCUUUUU	1374
AUCAGAAAGAACCUCAUU	637	AUCAGAAAGAACCUCAUU	637	AAUUGGAGGUUUUCUGAU	1375
AGACCCCAACCCACAAGAA	638	AGACCCCAACCCACAAGAA	638	UUCUUGUGGGUUGGGGUCU	1376
CAAGUAGAUAAUUAUGUCA	639	CAAGUAGAUAAUUAUGUCA	639	UGACUAAUUUAUCUACUUG	1377
AAAGCUAUAGGUACAGUAU	640	AAAGCUAUAGGUACAGUAU	640	AUACUGUACCUAUAGCUUU	1378
UGCUGCAUUAAGCAGCUG	641	UGCUGCAUUAAGCAGCUG	641	CAGCUGCUUUAUAGCAGCA	1379
UUUAAUUGCAUGGGUAAAA	642	UUUAAUUGCAUGGGUAAAA	642	UUUUAACCAUGCAUUUAAA	1380

【表25】

(110)

JP 2006-502694 A 2006.1.26

40

30

20

10

UUUCAGCAUUAUCAGAAG	643	UUUCAGCAUUAUCAGAAG	643	CUUCUGAUAAUGCUGAAAA	1381
ACUGCUUAAAGCCUCAUUA	644	ACUGCUUAAAGCCUCAUUA	644	UUUUUAGGCGUUAAGCAGU	1382
GGAAAGGACCAGCAAAGCU	645	GGAAAGGACCAGCAAAGCU	645	AGCUUUGCUGGUCUUUCC	1383
UGUACCAGUAAAAUUAAG	646	UGUACCAGUAAAAUUAAG	646	CUUUUAAUUUACUGGUACA	1384
GAAGAAAAAUAAAGCAU	647	GAAGAAAAAUAAAGCAU	647	AUGCUUUUAAUUUUUUCUUC	1385
GUGUACCCACAGACCCCAA	648	GUGUACCCACAGACCCCAA	648	UUGGGGUCUGUGGUACAC	1386
GGGGGGAUUGGGGGGUACA	649	GGGGGGAUUGGGGGGUACA	649	UGUACCCCCCAUCCCCC	1387
GGAAAGAGCGGAGACAGCG	650	GGAAAGAGCGGAGACAGCG	650	CGCUGUCUCCGCUUCUUC	1388
GAAGCGGAGACAGCGACGA	651	GAAGCGGAGACAGCGACGA	651	UCGUCGUCUGUCUCCGCUUC	1389
UUAAUUGCAUGGGUAAAG	652	UUAAUUGCAUGGGUAAAG	652	CUUUUACCCCAUGCAUUUA	1390
AACCCACUGCUUAGCCUC	653	AACCCACUGCUUAGCCUC	653	GAGGCUUAAAGCAGUGGGUU	1391
GUUUUCAGCAUUAUCAGAA	654	GUUUUCAGCAUUAUCAGAA	654	UUCUGAUAAUUGCUGAAAC	1392
GGAUUAAUAAAAUAGUAA	655	GGAUUAAUAAAAUAGUAA	655	UUACUAAUUUAAUUUAUCC	1393
GUACCCACAGACCCCAACC	656	GUACCCACAGACCCCAACC	656	GGUUGGGGUCUGUGGGUAC	1394
GAUUAAUAAAAUAGUAA	657	GAUUAAUAAAAUAGUAA	657	CUUACUAAUUUUUUAUUC	1395
AAGCCUCAUAAAGCUUGC	658	AAGCCUCAUAAAGCUUGC	658	GCAAGCUUUAUUGAGGCUU	1396
GCAGGACAUAAAGGUAAG	659	GCAGGACAUAAAGGUAAG	659	CUACCUUGUUUAUUGUCUG	1397
CCCACUGCUUAGCCUCA	660	CCCACUGCUUAGCCUCA	660	UUGAGGCUUAAAGCAGUGG	1398
GGGACUUCGCGUGGGGAC	661	GGGACUUCGCGUGGGGAC	661	GUCCCCAGCGGAAAGUCC	1399
AUCACCUAGAACUUUAAU	662	AUCACCUAGAACUUUAAU	662	AUUUAAAGGUUUAAGGUGU	1400
UAGAGCCUGGAAGCAUCC	663	UAGAGCCUGGAAGCAUCC	663	GGAUGCUUCCAGGGGCUUA	1401
GGGCUUGUGGAAUGUGGA	664	GGGCUUGUGGAAUGUGGA	664	UCCACAUUUUCCACAGCC	1402
UUUCAGCAUUAUCAGAAG	665	UUUCAGCAUUAUCAGAAG	665	CCUUCUGAUAAUUGCUGAA	1403
UGACCCAUCAAAAGACUUA	666	UGACCCAUCAAAAGACUUA	666	UAAGUCUUUUUGUGGGUAC	1404
AGAAAAAUAAAGCAUUA	667	AGAAAAAUAAAGCAUUA	667	UAAUGCUUUUUAUUUUUCU	1405
AGAAGCGGAGACAGCGACG	668	AGAAGCGGAGACAGCGACG	668	CGUCGCGUCUCUCCGCUUC	1406
AAGAAAAAUAAAGCAUUA	669	AAGAAAAAUAAAGCAUUA	669	AAUGCUUUUUAUUUUUUCU	1407
AAUGGAGAAAAUUAAGUAG	670	AAUGGAGAAAAUUAAGUAG	670	UCUACUAAUUUUUUCUUAU	1408
GCUGAACAUUUUAGACAG	671	GCUGAACAUUUUAGACAG	671	CUGUCUUAAGAUUUCAGC	1409
AAAAAGAAAAUUCAGUAA	672	AAAAAGAAAAUUCAGUAA	672	UUACUGAUUUUUUUCUUUU	1410
GAACAAGCCCGAGAGACC	673	GAACAAGCCCGAGAGACC	673	GGUCUUCUGGGGCUUGUUC	1411
GUGAUAAUUGUCAGCUAAA	674	GUGAUAAUUGUCAGCUAAA	674	UUUAGCUGACAUUUUACAC	1412
GAGCCUGGAAGCAUCCAG	675	GAGCCUGGAAGCAUCCAG	675	CUGGAUGCUUCCAGGGCUC	1413
AGUGGGGGGACAUCAAGCA	676	AGUGGGGGGACAUCAAGCA	676	UGCUUGAUUGUCCGCCACU	1414
GCCUGGGAGCUCUCUGGCU	677	GCCUGGGAGCUCUCUGGCU	677	AGCCAGAGAGCUCUCCAGGC	1415
UGGAAAGGACCAGCAAAGC	678	UGGAAAGGACCAGCAAAGC	678	GCUUUGCUGGUCUUUCCA	1416

AGCAGGACAUAAACAGGUA	679	AGCAGGACAUAAACAGGUA	679	UACCUUGUUAUGUCCUGCU	1417
CCUAGAACUUUAAUUGCAU	680	CCUAGAACUUUAAUUGCAU	680	AUGCAUUAUAAAGUUCUAGG	1418
AGUAGAUAAUUAUUGCAGU	681	AGUAGAUAAUUAUUGCAGU	681	ACUGACUAAUUUAUCUACU	1419
AAAUUAAAGCCAGGAAUUGG	682	AAAUUAAAGCCAGGAAUUGG	682	CCAUUCUCCGCUUUAUUUU	1420
AGUAAAAUAAAGCCAGGA	683	AGUAAAAUAAAGCCAGGA	683	UCCUGGCUUUAUUUUUUCU	1421
UGUGAUAAUUGUCAGCUAA	684	UGUGAUAAUUGUCAGCUAA	684	UUAGCUGACAUUUUACACA	1422
AGCCUGGAAGCAUCCAGG	685	AGCCUGGAAGCAUCCAGG	685	CCUGGAUGCUUCCAGGGCU	1423
CACUGCUUAAAGCCUCAUUA	686	CACUGCUUAAAGCCUCAUUA	686	UAUUUAGGCUUUAAGCAGUG	1424
AAAAAUUCAGUAAACAGUAC	687	AAAAAUUCAGUAAACAGUAC	687	GUACUGUUACUGAUUUUUU	1425
GAGCCUGGGAGCUCUCUGG	688	GAGCCUGGGAGCUCUCUGG	688	CCAGAGAGCUCUCCAGGCUC	1426
UUCGCGUGGGGACUUUCCA	689	UUCGCGUGGGGACUUUCCA	689	UGGAAAGUCCCGACGCGAA	1427
GAGAGACAGGCUAAUUUUU	690	GAGAGACAGGCUAAUUUUU	690	AAAAUUUAGCGUCUCUCUC	1428
GCUGUGAUAAUUGUCAGCU	691	GCUGUGAUAAUUGUCAGCU	691	AGCUGACAUUUUACACAGC	1429
CCACAGACCCCAACCCACA	692	CCACAGACCCCAACCCACA	692	UGUGGGUUGGGGUCUGUGG	1430
CAGGAAGAAAGCGGAGACAG	693	CAGGAAGAAAGCGGAGACAG	693	CUGUCUCCGCUUCUCCUC	1431
UAAAGCCUCAUAAAGCUUG	694	UAAAGCCUCAUAAAGCUUG	694	CAAGCUUUUUAUUGAGGCUA	1432
UAAAAAGAAAAAUUCAGU	695	UAAAAAGAAAAAUUCAGU	695	ACUGAUUUUUUUCUUUUUA	1433
GACAGAAAGAAAAUAAAA	696	GACAGAAAGAAAAUAAAA	696	UUUUUUAUUUUUCUUCUGUC	1434
GUACCAUAAAUUAAAGC	697	GUACCAUAAAUUAAAGC	697	GCUUUAAUUUUAUCUGUAC	1435
AAAAAGAAAAUUCAGUAA	698	AAAAAGAAAAUUCAGUAA	698	GUUACUGAUUUUUUCUUUU	1436
AAAAAUUCAGUAAACAGUACU	699	AAAAAUUCAGUAAACAGUACU	699	AGUACUGUUAUCUGAUUUUU	1437
AGAGCCUGGAAGCAUCCA	700	AGAGCCUGGAAGCAUCCA	700	UGGAUGCUUCCAGGGGCUU	1438
CAGGGGCAAUUGGUACAUC	701	CAGGGGCAAUUGGUACAUC	701	GAUGUACCAUUUGCCCUUG	1439
CUGCAUUUACCAUACCUAG	702	CUGCAUUUACCAUACCUAG	702	CUAGGUUUGGUAAUUGCAG	1440
UAAUUGCAUGGGUAAAGU	703	UAAUUGCAUGGGUAAAGU	703	ACUUUUUACCAUGCAUUUA	1441
AAGUAAACAUAGUACAGA	704	AAGUAAACAUAGUACAGA	704	UCUGUUUACUAGUUUACU	1442
CCACACAUGCCUGUGUACC	705	CCACACAUGCCUGUGUACC	705	GGUACACAGGCAUGUGUGG	1443
AGUAGAUUUUACAGAGACU	706	AGUAGAUUUUACAGAGACU	706	AAGUUCUCUGAAAUUCUACU	1444
CAUCAGAAAGAACCUCCA	707	CAUCAGAAAGAACCUCCA	707	AUGGAGGUUCUUUCUGUAG	1445
ACCAGUAAAAUAAAGCCA	708	ACCAGUAAAAUAAAGCCA	708	UGGCUUUAAUUUUUACUGU	1446
CACAGACCCCAACCCACA	709	CACAGACCCCAACCCACA	709	UUGUGGGUUGGGGUCUGUG	1447
AGGGGGGAUUGGGGGGUAC	710	AGGGGGGAUUGGGGGGUAC	710	GUACCCCAUUCUCCCUU	1448
UGCAUUUACCAUACCUAGU	711	UGCAUUUACCAUACCUAGU	711	ACUAGGUUAGGUAAUUGCA	1449
CAUUGGACAUCAAAUUU	712	CAUUGGACAUCAAAUUU	712	AAUUUUGAUUUGUCCAUUG	1450
CUGAACAUUUUAGACAGC	713	CUGAACAUUUUAGACAGC	713	GCUGUCUUUAGAUUUUCAG	1451
GCCUCAUAAAGCUUGCCU	714	GCCUCAUAAAGCUUGCCU	714	AGGCAAGCUUUUUGAGGC	1452



UGUACCCACAGACCCCAAC	715	UGUACCCACAGACCCCAAC	715	GUUGGGGUCUGUGGGUACA	1453
GAAGUAAACAUAGUACAG	716	GAAGUAAACAUAGUACAG	716	CUGUUAUUAUGUUUACUUC	1454
GUAGGACCUACACCCUGUCA	717	GUAGGACCUACACCCUGUCA	717	UGACAGGUGUAGGUCCUAC	1455
CAGUGGGGGGACAUCAAGC	718	CAGUGGGGGGACAUCAAGC	718	GCUUGAUUGUCCGCCACUG	1456
ACCCACUUCUUAAGCCUCA	719	ACCCACUUCUUAAGCCUCA	719	UGAGGCUUAAGCAGUGGGU	1457
AAAAUUUGGGCCUGAAAAU	720	AAAAUUUGGGCCUGAAAAU	720	AUUUUCAGGCCCAUUUUU	1458
UGGGGGGACAUCAAGCAGC	721	UGGGGGGACAUCAAGCAGC	721	GCUGCUUGAUUGCCCCCA	1459
GUACAAUUGGCAGUAUUA	722	GUACAAUUGGCAGUAUUA	722	UGAAUACUGCCAUUUUAC	1460
AAGCUAUAGGUACAGUAUU	723	AAGCUAUAGGUACAGUAUU	723	AAUACUGUACCUAUAGCUU	1461
CAGAAGAAAAUAAAAGC	724	CAGAAGAAAAUAAAAGC	724	GCUUUUUUUUUUUUCUCUG	1462
AAUUGCAUGGGUAAAAGUA	725	AAUUGCAUGGGUAAAAGUA	725	UACUUUUUACCCAUUUU	1463
AGCCUCAUUAAGCCUUGCC	726	AGCCUCAUUAAGCCUUGCC	726	GGCAAGCUUUUUUGAGGCU	1464
CCACUGCUUAAGCCUCAAU	727	CCACUGCUUAAGCCUCAAU	727	AUUGAGGCUUAAGCAGUGG	1465
AAGAAGCGGAGACGCGAC	728	AAGAAGCGGAGACGCGAC	728	GUCGCUUCUCCGCUUUU	1466
AAUUGGAGAAAAUUAAGUAG	729	AAUUGGAGAAAAUUAAGUAG	729	CUACUAAUUUUCUCCAUUU	1467
AGCCUGGGAGCUCUCUGGC	730	AGCCUGGGAGCUCUCUGGC	730	GCCAGAGAGCUCUCCAGGCU	1468
AACAAGCCCGAGAAGACCA	731	AACAAGCCCGAGAAGACCA	731	UGGUCUUCUGGGGCUUUU	1469
UACCAGUAAAAUUAAGCC	732	UACCAGUAAAAUUAAGCC	732	GGCUUUUUAUUUUAUCUGUA	1470
UUCAAAAAUUGGGCCUGAA	733	UUCAAAAAUUGGGCCUGAA	733	UUCAGGCCCAUUUUUUGAA	1471
AGAAGAAAAUUAAGGCA	734	AGAAGAAAAUUAAGGCA	734	UGCUUUUUUUUUUUCUUCU	1472
CUGUGUACCCACAGACCCC	735	CUGUGUACCCACAGACCCC	735	GGGUCUGUGGGUACACAG	1473
GCCUGUACUGGGUCUCUCU	736	GCCUGUACUGGGUCUCUCU	736	AGAGAGACCCAGUACAGGC	1474
CAGUAAAAUUAAGCCAGG	737	CAGUAAAAUUAAGCCAGG	737	CCUGGGCUUUUUUUUACUG	1475
UACAAUUGGCAGUAUUAU	738	UACAAUUGGCAGUAUUAU	738	AUGAAUACUGCCAUUUUGA	1476

siRNAコンストラクトの上側配列および下側配列の3'末端は、例えば、約1, 2, 3, または4ヌクレオチドの長さ、好ましくは2ヌクレオチドの長さのオーバーハング配列を含むことができ、下側配列のオーバーハング配列は任意に標的配列の一部と相補的であってもよい。上側配列はセンス鎖とも称され、下側配列はアンチセンス鎖とも称される。表中の上側配列および下側配列は、さらに式I-VIIまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学修飾を含むことができる。

表 III: HIV 合成修飾 siRNA コンストラクト

標的 位置	標的	配列 番号	RPI 番号	別名	配列	配列 番号
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36		HIV43:1399U21 siRNA sense	ACCAUCAUAGAGGAAGCUGTT	1483
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUUA	8		HIV43:2323U21 siRNA sense	UAGAUACAGGAGCAGAUATT	1484
2328	ACAGGAGCAGAUUAACAG	5		HIV43:2328U21 siRNA sense	ACAGGAGCAGAUUAACAGTT	1485
4930	UUUGGAAAGGACCAAGCAA	1		HIV43:4930U21 siRNA sense	UUUGGAAAGGACCAAGCAATT	1486
5077	GUAGACAGGAUAGGAUUA	4		HIV43:5077U21 siRNA sense	GUAGACAGGAUAGGAUUAATT	1487
5955	CUUAGGCAUCCCUAUGGC	99		HIV43:5955U21 siRNA sense	CUUAGGCAUCCCUAUGGCTT	1488
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477		HIV43:5982U21 siRNA sense	GCGGAGACAGCGACGAAGATT	1489
8499	GCCUGUGCCCUUUCAGCUA	1478		HIV43:8499U21 siRNA sense	GCCUGUGCCCUUUCAGCUATT	1490
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36		HIV43:1417L21 siRNA (1399C) antisense	CAGCUUCCCUAUAUAGGUTT	1491
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUUA	8		HIV43:2341L21 siRNA (2323C) antisense	UUAUUCUGCCCUUAUUAUATT	1492
2328	ACAGGAGCAGAUUAACAG	5		HIV43:2346L21 siRNA (2328C) antisense	CUGUAUUAUUCUCCUUGUTT	1493
4930	UUUGGAAAGGACCAAGCAA	1		HIV43:4948L21 siRNA (4930C) antisense	UUUGCUGGCUUUAUUAUATT	1494
5077	GUAGACAGGAUAGGAUUA	4		HIV43:5095L21 siRNA (5077C) antisense	UUAUCCCUAUCUUCUUAUATT	1495
5955	CUUAGGCAUCCCUAUGGC	99		HIV43:5973L21 siRNA (5955C) antisense	GCCAUAGGAGAUUCCUUAUATT	1496
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477		HIV43:6000L21 siRNA (5982C) antisense	UCCUUGGCGGCUUCCGCTT	1497
8499	GCCUGUGCCCUUUCAGCUA	1478		HIV43:8517L21 siRNA (8499C) antisense	UAGCUGAAGAGGCACAGGCTT	1498
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36		HIV43:1399U21 siRNA stab04 sense	B AccAUAUAGAGGAAGGUTT B	1499
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUUA	8		HIV43:2323U21 siRNA stab04 sense	B uAGAUuACAGGAGCAGAUATT B	1500
2328	ACAGGAGCAGAUUAACAG	5		HIV43:2328U21 siRNA stab04 sense	B AcAGGAGCAGAUUAuAGATT B	1501
4930	UUUGGAAAGGACCAAGCAA	1		HIV43:4930U21 siRNA stab04 sense	B uuUGGAAAGGAGAcAGCAATT B	1502
5077	GUAGACAGGAUAGGAUUA	4		HIV43:5077U21 siRNA stab04 sense	B GuAGACAGGAUAGGAuATT B	1503
5955	CUUAGGCAUCCCUAUGGC	99		HIV43:5955U21 siRNA stab04 sense	B cuuAGGCAUCCCUuAGGCTT B	1504
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477		HIV43:5982U21 siRNA stab04 sense	B GcGAGAGAcAGCAGCAAGATT B	1505
8499	GCCUGUGCCCUUUCAGCUA	1478		HIV43:8499U21 siRNA stab04 sense	B GccuGUCCCUuACGUAATT B	1506
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36		HIV43:1417L21 siRNA (1399C) stab05 antisense	cAGCUUCCCUAUAUAGGUTS	1507
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUUA	8		HIV43:2341L21 siRNA (2323C) stab05 antisense	uAucUuGCUCCUUAUAUATST	1508
2328	ACAGGAGCAGAUUAACAG	5		HIV43:2346L21 siRNA (2328C) stab05 antisense	cuGuAuAUCUCCCUuGuTST	1509
4930	UUUGGAAAGGACCAAGCAA	1		HIV43:4948L21 siRNA (4930C) stab05 antisense	uuUGCuGUCCCUuAAATST	1510
5077	GUAGACAGGAUAGGAUUA	4		HIV43:5095L21 siRNA (5077C) stab05 antisense	uAUCCUcAUCCUuAGTST	1511
5955	CUUAGGCAUCCCUAUGGC	99		HIV43:5973L21 siRNA (5955C) stab05 antisense	GccAUAGGAGAUuGCUAAGTST	1512
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31238	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) stab05 antisense	uCUUcGUCCCUuGCUuGCTST	1513
8499	GCCUGUGCCCUUUCAGCUA	1478	31237	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) stab05 antisense	uAGCuGAAGAGGAcAGGCTST	1514
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36		HIV43:1399U21 siRNA stab07 sense	B AccAUAUAGAGGAAGGUTT B	1515



2323	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8		HIV43:2323U21 siRNA stab07 sense	B uAGAUAcAGGAGCAGAUGATT B	1516
2328	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5		HIV43:2328U21 siRNA stab07 sense	B AcAGGAGCAGAUGAUAcAGTT B	1517
4930	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1		HIV43:4930U21 siRNA stab07 sense	B uuUGGAAAGGACCAGCAAAATT B	1518
5077	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4		HIV43:5077U21 siRNA stab07 sense	B GuAGAcAGGAUGAGGAuUATT B	1519
5955	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99		HIV43:5955U21 siRNA stab07 sense	B cuuAGGCAuUccuAuGcGcTT B	1520
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477		HIV43:5982U21 siRNA stab07 sense	B GcGGAGAcAGcGAcGAAGATT B	1521
8499	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478		HIV43:8499U21 siRNA stab07 sense	B GccuGuGccuGccuAGcUATT B	1522
1399	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36		HIV43:1417L21 siRNA (1399C) stab11 antisense	cAGcuuccuAuUcAuGcUATsT	1523
2323	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8		HIV43:2341L21 siRNA (2323C) stab11 antisense	ucAuccuGuccuGuAuccuATsT	1524
2328	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5		HIV43:2348L21 siRNA (2328C) stab11 antisense	cuGuAucAuccuGuccuGuTsT	1525
4930	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1		HIV43:4948L21 siRNA (4930C) stab11 antisense	uuuGcuGuccuuccAAATsT	1526
5077	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4		HIV43:5095L21 siRNA (5077C) stab11 antisense	uAUuccuAcuccuGuUcATsT	1527
5955	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99		HIV43:5973L21 siRNA (5955C) stab11 antisense	GccAuAGGAGAUccuAAATsT	1528
5982	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31240	HIV43:8000L21 siRNA (5982C) stab11 antisense	uccuGcGcGcGuccGcTsT	1529
8499	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31241	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) stab11 antisense	uAGcuGAAGAGGcAcAGGcTsT	1530
	AGGGGAAGUGACAUAAGCAGGAAC	1479	30793	HIV:1484U21 siRNA stab04 sense	B GGGAAUGcAcAuAGcAGGATT B	1531
	CAGAGAUAGGAAAGGAAGGAAA	1480	30794	HIV:2668U21 siRNA stab04 sense	B GAGAUAGGAAAGGAAGGATT B	1532
	CUUGGAGGAGGAGAUAGGGGA	1481	30795	HIV:7633U21 siRNA stab04 sense	B uGGAGGAGGAGAUAGGATT B	1533
	CUGGAAAGGAGGACAUACAC	1482	30796	HIV:8908U21 siRNA stab04 sense	B GGAAGAAcAuGGAGcAAuTt B	1534
	AGGGGAAGUGACAUAAGCAGGAAC	1479	30797	HIV:1502L21 siRNA (1484C) stab05 antisense	uccuGcuAuGcAcuuccTsT	1535
	CAGAGAUAGGAAAGGAAGGAAA	1480	30798	HIV:2684L21 siRNA (2686C) stab05 antisense	uccuuccuuccuuccuuccTsT	1536
	CUUGGAGGAGGAGAUAGGGGA	1481	30799	HIV:7651L21 siRNA (7633C) stab05 antisense	ccuAuAuccuuccuuccATsT	1537
	CUGGAAAGGAGGACAUACAC	1482	30800	HIV:8924L21 siRNA (8908C) stab05 antisense	GAuUGuccuAuGuuuuccTsT	1538
	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	31218	HIV43:1399U21 siRNA stab09 sense	B CAGCUUCCUUAUUGAUUGUTT B	1539
	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31219	HIV43:2323U21 siRNA stab09 sense	B UCAUCUGCUCUGUAUCUATT B	1540
	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31220	HIV43:2328U21 siRNA stab09 sense	B CUGUAUACUCCUGCCUGUTT B	1541
	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	31221	HIV43:4930U21 siRNA stab09 sense	B UUUGCUGGUCUUCUCCAATT B	1542
	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	31222	HIV43:5077U21 siRNA stab09 sense	B UAUAUCUUAUCCUGCUUACTT B	1543
	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	31223	HIV43:5955U21 siRNA stab09 sense	B GCCAUAGGAGAUCCUAAATT B	1544
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31224	HIV43:5982U21 siRNA stab09 sense	B UCUUCUGCUGUGUCUCCGCTT B	1545
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31225	HIV43:8499U21 siRNA stab09 sense	B UAGCUGAAGAGGACAGGCTT B	1546
	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	31226	HIV43:1417L21 siRNA (1399C) stab10 antisense	CAGCUUCCUUAUUGAUUGUTT B	1547
	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31227	HIV43:2341L21 siRNA (2323C) stab10 antisense	UCAUCUGCUCUGUAUCUATsT	1548
	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31228	HIV43:2348L21 siRNA (2328C) stab10 antisense	CUGUAUACUCCUGCCUGUTsT	1549
	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	31229	HIV43:4948L21 siRNA (4930C) stab10 antisense	UUUGCUGGUCUUCUCCAATT B	1550
	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	31230	HIV43:5095L21 siRNA (5077C) stab10 antisense	UAUAUCUUAUCCUGCUUACTsT	1551
	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	31231	HIV43:5973L21 siRNA (5955C) stab10 antisense	GCCAUAGGAGAUCCUAAATsT	1552
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31232	HIV43:8000L21 siRNA (5982C) stab10 antisense	UCUUCUGCUGUCUCCGCTsT	1553

【表3.0】

(115)

JP 2006-502694 A 2006.1.26

	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31233	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) stab10 antisense	UAGCUGAAGAGGACAGGCTsT	1554
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31234	HIV43:5982U21 siRNA stab04 sense	B uccuGcGcGcGuccGcTsT B	1555
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31235	HIV43:8499U21 siRNA stab04 sense	B uAGcuGAAGAGGcAcAGGcTT B	1556
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31238	HIV43:5982U21 siRNA stab07 antisense	B uccuGcGcGcGuccGcTsT B	1557
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31239	HIV43:8499U21 siRNA stab07 antisense	B uAGcuGAAGAGGcAcAGGcTT B	1558
	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	31242	HIV43:1399U21 siRNA inv stab09 sense	B GUCGAAGGAGUAACUACATT B	1559
	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31243	HIV43:2323U21 siRNA inv stab09 sense	B AGUAGACGAGGACAUAGAUtt B	1560
	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31244	HIV43:2328U21 siRNA inv stab09 sense	B GACAUAGUAGACGAGGACATT B	1561
	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	31245	HIV43:4930U21 siRNA inv stab09 sense	B AAACGACGAGGAAAGGUUtt B	1562
	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	31246	HIV43:5077U21 siRNA inv stab09 sense	B AUUAGGAGUAGGACAGUcTT B	1563
	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	31247	HIV43:5955U21 siRNA inv stab09 sense	B CGGUAUCCUCUACGGAUUcTT B	1564
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31248	HIV43:5982U21 siRNA inv stab09 sense	B AGAAGCAGCAGACAGAGGcTT B	1565
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31249	HIV43:8499U21 siRNA inv stab09 sense	B AUCGACUUCUCCUGUCCGTT B	1566
	ACCAUCAUAGAGGAAGCUG	36	31250	HIV43:1417L21 siRNA (1399C) inv stab10 antisense	UGUAUUAUCCUCCUCCACTsT	1567
	UAGAUACAGGAGCAGAUGA	8	31251	HIV43:2341L21 siRNA (2323C) inv stab10 antisense	AUCUAUUGCCUCCUCCUATsT	1568
	ACAGGAGCAGAUGAUACAG	5	31252	HIV43:2348L21 siRNA (2328C) inv stab10 antisense	UGUCCUCCUCCUCCUCCUATsT	1569
	UUUGGAAAGGACCAGCAAA	1	31253	HIV43:4948L21 siRNA (4930C) inv stab10 antisense	AAACCUUCCUCCUCCUCCUATsT	1570
	GUAGACAGGAUGAGGAUUA	4	31254	HIV43:5095L21 siRNA (5077C) inv stab10 antisense	CAUCUGUCCUACUCCUAAUtsT	1571
	CUUAGGCAUCUCCUAUGGC	99	31255	HIV43:5973L21 siRNA (5955C) inv stab10 antisense	GAAUCCGUAGAGGAUACCGTsT	1572
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31256	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) inv stab10 antisense	CGCCUCUGCUGCUGCUGCUTsT	1573
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31257	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) inv stab10 antisense	CGGACACGAGGAAGUCCAUtsT	1574
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31258	HIV43:5982U21 siRNA inv stab04 sense	B AGAAGcAGcAcAGAGGcGTT B	1575
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31259	HIV43:8499U21 siRNA inv stab04 sense	B AucGAcuuccGuGuccGTT B	1576
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31260	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) inv stab05 antisense	cGccuGuGcGcGuccuTsT	1577
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31261	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) inv stab05 antisense	cGGAcAcGGAAGAcGcGcUtsT	1578
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31262	HIV43:5982U21 siRNA inv stab07 sense	B AGAAGcAGcAcAGAGGcGTT B	1579
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31263	HIV43:8499U21 siRNA inv stab07 sense	B AucGAcuuccGuGuccGTT B	1580
	GCGGAGACAGCGACGAAGA	1477	31264	HIV43:6000L21 siRNA (5982C) inv stab11 antisense	cGccuGuGcGcGuccuTsT	1581
	GCCUGUGCCUCUUCAGCUA	1478	31265	HIV43:8517L21 siRNA (8499C) inv stab11 antisense	cGGAcAcGGAAGAcGcUtsT	1582

【表3.1】

(116)

JP 2006-502694 A 2006.1.26

大文字 = リボヌクレオチド

u,c = 2'-デオキシ-2'-フルオロ U,C

T = チミン

B = 反転デオキシ無塩基

s = ホスホロチオエート結合

A = デオキシアデニン

G = デオキシグアニン

【表 3 2】

(117)

表IV  
化学的に修飾されたsiNA構築物用の安定化化学の非限定的例

化学	ピリミジン	プリン	キャップ	p=S	鎖
"Stab1"	リボ	リボ	—	5'末端に5 3'末端に1	S/AS
"Stab2"	リボ	リボ	—	全結合	通常はAS
"Stab3"	2'-フルオロ	リボ	—	5'末端に4 3'末端に4	通常はS
"Stab4"	2'-フルオロ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab5"	2'-フルオロ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab6"	2'-O-メチル	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab7"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab8"	2'-フルオロ	2'-O-メチル	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab9"	リボ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab10"	リボ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab11"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	—	3'末端に1	通常はAS

Cap = 任意の末端キャップ, 例えば, 図 10 を参照。

Stab 1-11 化学はすべて 3'-末端チミン(TT) 残基を含むことができる。

Stab 1-11 化学はすべて、典型的には 21ヌクレオチドを含むが、本明細書に記載されるようにこれはさまざまであり得る。

S = センス鎖

AS = アンチセンス鎖

【表 3 3】

表V

(118)

JP 2006-502694 A 2006.1.26

A. 2.5 μmol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホリブミダイト	6.5	163 μL	45 sec	2.5 min	7.5 min
5-エチルチトリアル	23.8	238 μL	45 sec	2.5 min	7.5 min
無水酢酸	100	233 μL	5 sec	5 sec	5 sec
ルチル/ミダイト	168	233 μL	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	176	2.3 mL	21 sec	21 sec	21 sec
ヨウ素	112	1.7 mL	45 sec	45 sec	45 sec
ボーラーズ	12.9	645 μL	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	6.67 mL	NA	NA	NA

B. 0.2 μmol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホリブミダイト	16	31 μL	45 sec	233 sec	465 sec
5-エチルチトリアル	38.7	31 μL	45 sec	233 min	465 sec
無水酢酸	655	124 μL	5 sec	5 sec	5 sec
ルチル/ミダイト	1245	124 μL	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	700	732 μL	10 sec	10 sec	10 sec
ヨウ素	20.6	244 μL	15 sec	15 sec	15 sec
ボーラーズ	7.7	232 μL	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	2.64 mL	NA	NA	NA

C. 0.2 μmol 合成サイクル 96 ウェル装置

試薬	当量 DNA 2'-O-メチル	量 DNA 2'-O-メチル	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホリブミダイト	2233/66	40/60/120 μL	60 sec	160 sec	360 sec
5-エチルチトリアル	70/105/210	40/60/120 μL	60 sec	160 min	360 sec
無水酢酸	255/265/265	50/50/50 μL	10 sec	10 sec	10 sec
ルチル/ミダイト	502/502/502	50/50/50 μL	10 sec	10 sec	10 sec
TCA	238/475/475	250/500/500 μL	15 sec	15 sec	15 sec
ヨウ素	6.8/6.8/6.8	60/60/60 μL	30 sec	30 sec	30 sec
ボーラーズ	345/151	60/120/120	100 sec	200 sec	200 sec
アセトニトリル	NA	1150/1150/1150 μL	NA	NA	NA

- 待機時間は輸送の間の接触時間を含まない
- 2'-O-メチル合成にはリンカー分子のサイクルカッパを利用する

【図面の簡単な説明】

【図 3 8 4】

【図 1】図 1 は、siNA 分子を合成するスキームの例を示す。

【図 2】図 2 は、本発明の方法により合成された精製 siNA デュープレックスの MALDI-TOF 質量分析を示す。

【図 3】図 3 は、RNAi に関与する標的 RNA 分解の提唱されるメカニズムの例を示す

【0383】

表IV

化学的に修飾されたsiNA構築物用の安定化化学の非限定的例

化学	ピリミジン	プリン	キャップ	p=S	鎖
"Stab1"	リボ	リボ	—	5'末端に5 3'末端に1	S/AS
"Stab2"	リボ	リボ	—	全結合	通常はAS
"Stab3"	2'-フルオロ	リボ	—	5'末端に4 3'末端に4	通常はS
"Stab4"	2'-フルオロ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab5"	2'-フルオロ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab6"	2'-O-メチル	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab7"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab8"	2'-フルオロ	2'-O-メチル	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab9"	リボ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab10"	リボ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab11"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	—	3'末端に1	通常はAS

Cap = 任意の末端キャップ, 例えば, 図 10 を参照。

Stab 1-11 化学はすべて 3'-末端チミン(TT) 残基を含むことができる。

Stab 1-11 化学はすべて、典型的には 21ヌクレオチドを含むが、本明細書に記載されるようにこれはさまざまであり得る。

S = センス鎖

AS = アンチセンス鎖

(117)

【表 3 3】

表V

(118)

JP 2006-502694 A 2006.1.26

A. 2.5 μmol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホリブミダイト	6.5	163 μL	45 sec	2.5 min	7.5 min
5-エチルチトリアル	23.8	238 μL	45 sec	2.5 min	7.5 min
無水酢酸	100	233 μL	5 sec	5 sec	5 sec
ルチル/ミダイト	168	233 μL	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	176	2.3 mL	21 sec	21 sec	21 sec
ヨウ素	112	1.7 mL	45 sec	45 sec	45 sec
ボーラーズ	12.9	645 μL	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	6.67 mL	NA	NA	NA

B. 0.2 μmol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホリブミダイト	16	31 μL	45 sec	233 sec	465 sec
5-エチルチトリアル	38.7	31 μL	45 sec	233 min	465 sec
無水酢酸	655	124 μL	5 sec	5 sec	5 sec
ルチル/ミダイト	1245	124 μL	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	700	732 μL	10 sec	10 sec	10 sec
ヨウ素	20.6	244 μL	15 sec	15 sec	15 sec
ボーラーズ	7.7	232 μL	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	2.64 mL	NA	NA	NA

C. 0.2 μmol 合成サイクル 96 ウェル装置

試薬	当量 DNA 2'-O-メチル	量 DNA 2'-O-メチル	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホリブミダイト	2233/66	40/60/120 μL	60 sec	160 sec	360 sec
5-エチルチトリアル	70/105/210	40/60/120 μL	60 sec	160 min	360 sec
無水酢酸	255/265/265	50/50/50 μL	10 sec	10 sec	10 sec
ルチル/ミダイト	502/502/502	50/50/50 μL	10 sec	10 sec	10 sec
TCA	238/475/475	250/500/500 μL	15 sec	15 sec	15 sec
ヨウ素	6.8/6.8/6.8	60/60/60 μL	30 sec	30 sec	30 sec
ボーラーズ	345/151	60/120/120	100 sec	200 sec	200 sec
アセトニトリル	NA	1150/1150/1150 μL	NA	NA	NA

- 待機時間は輸送の間の接触時間を含まない
- 2'-O-メチル合成にはリンカー分子のサイクルカッパを利用する

【図面の簡単な説明】

【図 3 8 4】

【図 1】図 1 は、siNA 分子を合成するスキームの例を示す。

【図 2】図 2 は、本発明の方法により合成された精製 siNA デュープレックスの MALDI-TOF 質量分析を示す。

【図 3】図 3 は、RNAi に関与する標的 RNA 分解の提唱されるメカニズムの例を示す

【0383】

表IV

化学的に修飾されたsiNA構築物用の安定化化学の非限定的例

化学	ピリミジン	プリン	キャップ	p=S	鎖
"Stab1"	リボ	リボ	—	5'末端に5 3'末端に1	S/AS
"Stab2"	リボ	リボ	—	全結合	通常はAS
"Stab3"	2'-フルオロ	リボ	—	5'末端に4 3'末端に4	通常はS
"Stab4"	2'-フルオロ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab5"	2'-フルオロ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab6"	2'-O-メチル	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab7"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab8"	2'-フルオロ	2'-O-メチル	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab9"	リボ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab10"	リボ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab11"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	—	3'末端に1	通常はAS

Cap = 任意の末端キャップ, 例えば, 図 10 を参照。

Stab 1-11 化学はすべて 3'-末端チミン(TT) 残基を含むことができる。

Stab 1-11 化学はすべて、典型的には 21ヌクレオチドを含むが、本明細書に記載されるようにこれはさまざまであり得る。

S = センス鎖

AS = アンチセンス鎖

(117)

【表 3 3】

表V

(118)

JP 2006-502694 A 2006.1.26

A. 2.5 μmol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホリブミダイト	6.5	163 μL	45 sec	2.5 min	7.5 min
5-エチルチトリアル	23.8	238 μL	45 sec	2.5 min	7.5 min
無水酢酸	100	233 μL	5 sec	5 sec	5 sec
ルチル/ミダイト	168	233 μL	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	176	2.3 mL	21 sec	21 sec	21 sec
ヨウ素	112	1.7 mL	45 sec	45 sec	45 sec
ボーラーズ	12.9	645 μL	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	6.67 mL	NA	NA	NA

B. 0.2 μmol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホリブミダイト	16	31 μL	45 sec	233 sec	465 sec
5-エチルチトリアル	38.7	31 μL	45 sec	233 min	465 sec
無水酢酸	655	124 μL	5 sec	5 sec	5 sec
ルチル/ミダイト	1245	124 μL	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	700	732 μL	10 sec	10 sec	10 sec
ヨウ素	20.6	244 μL	15 sec	15 sec	15 sec
ボーラーズ	7.7	232 μL	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	2.64 mL	NA	NA	NA

C. 0.2 μmol 合成サイクル 96 ウェル装置

試薬	当量 DNA 2'-O-メチル	量 DNA 2'-O-メチル	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホリブミダイト	2233/66	40/60/120 μL	60 sec	160 sec	360 sec
5-エチルチトリアル	70/105/210	40/60/120 μL	60 sec	160 min	360 sec
無水酢酸	255/265/265	50/50/50 μL	10 sec	10 sec	10 sec
ルチル/ミダイト	502/502/502	50/50/50 μL	10 sec	10 sec	10 sec
TCA	238/475/475	250/500/500 μL	15 sec	15 sec	15 sec
ヨウ素	6.8/6.8/6.8	60/60/60 μL	30 sec	30 sec	30 sec
ボーラーズ	345/151	60/120/120	100 sec	200 sec	200 sec
アセトニトリル	NA	1150/1150/1150 μL	NA	NA	NA

- 待機時間は輸送の間の接触時間を含まない
- 2'-O-メチル合成にはリンカー分子のサイクルカッパを利用する

【図面の簡単な説明】

【図 3 8 4】

【図 1】図 1 は、siNA 分子を合成するスキームの例を示す。

【図 2】図 2 は、本発明の方法により合成された精製 siNA デュープレックスの MALDI-TOF 質量分析を示す。

【図 3】図 3 は、RNAi に関与する標的 RNA 分解の提唱されるメカニズムの例を示す

【0383】

表IV

化学的に修飾されたsiNA構築物用の安定化化学の非限定的例

化学	ピリミジン	プリン	キャップ	p=S	鎖
"Stab1"	リボ	リボ	—	5'末端に5 3'末端に1	S/AS
"Stab2"	リボ	リボ	—	全結合	通常はAS
"Stab3"	2'-フルオロ	リボ	—	5'末端に4 3'末端に4	通常はS
"Stab4"	2'-フルオロ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab5"	2'-フルオロ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab6"	2'-O-メチル	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab7"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab8"	2'-フルオロ	2'-O-メチル	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab9"	リボ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab10"	リボ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab11"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	—	3'末端に1	通常はAS

Cap = 任意の末端キャップ, 例えば, 図 10 を参照。

Stab 1-11 化学はすべて 3'-末端チミン(TT) 残基を含むことができる。

Stab 1-11 化学はすべて、典型的には 21ヌクレオチドを含むが、本明細書に記載されるようにこれはさまざまであり得る。

S = センス鎖

AS = アンチセンス鎖

(117)

【表 3 3】

表V

(118)

JP 2006-502694 A 2006.1.26

A. 2.5 μmol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間 DNA	待機時間 2'-O-メチル	待機時間 RNA
ホスホリブミダイト	6.5	163 μL	45 sec	2.5 min	7.5 min
5-エチルチトリアル	23.8	238 μL	45 sec	2.5 min	7.5 min
無水酢酸	100	233 μL	5 sec	5 sec	5 sec
ルチル/ミダイト	168	233 μL	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	176	2.3 mL	21 sec	21 sec	21 sec
ヨウ素	112	1.7 mL	45 sec	45 sec	45 sec
ボーラーズ	12.9	645 μL	100 sec	300 sec	300 sec
アセチトリアル	NA	6.67 mL	NA	NA	NA

図である。

【図4】図4は、化学的に修飾されたsINAコンストラクトの例を示す。

【図5】図5は、化学的に修飾された特定のsINA配列の例を示す。

【図6】図6は、種々sINAコンストラクトの例を示す。

【図7】図7は、sINAヘアピンコンストラクトを生成するための発現カセットを作製するために用いられるスキームの概略図である。

【図8】図8は、発現カセットを作製して二本鎖sINAコンストラクトを生成するために用いられるスキームの概略図である。

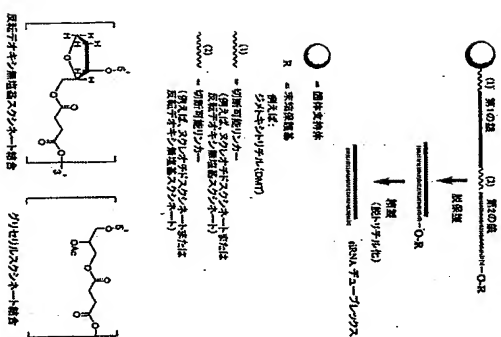
【図9】図9は、特定の標的核酸配列を決定するために用いられる方法の概略図である。

【図10】図10は、sINA配列の3'末端を安定化させるために用いられることができる種々の安定化化学の例を示す。

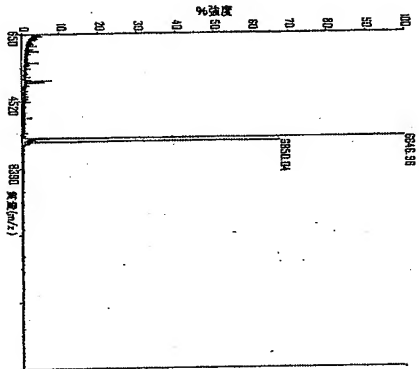
【図11】図11は、化学的に修飾されたsINAコンストラクトを固定するために用いられる概略の例を示す。

10

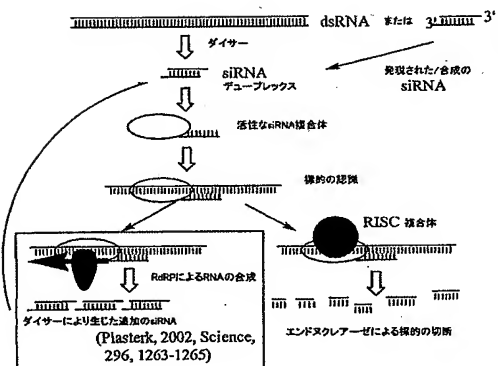
【図1】



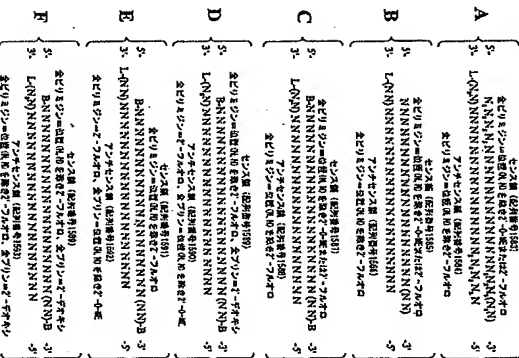
【図2】



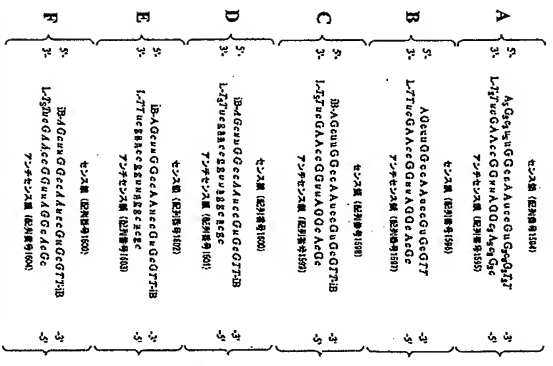
【図3】



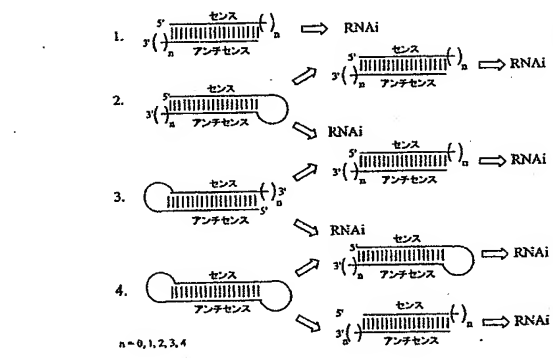
【図4】

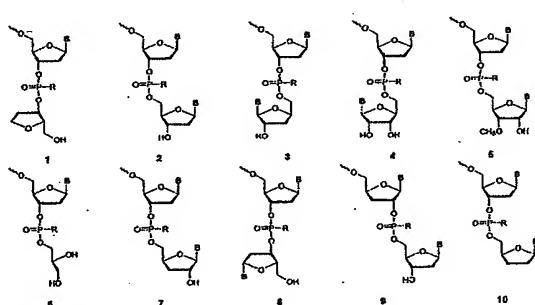
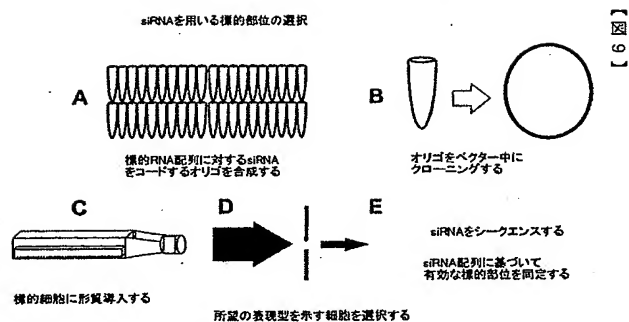
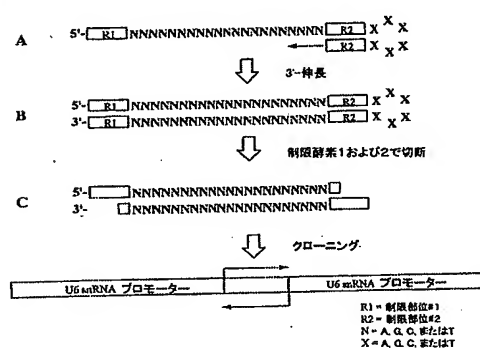
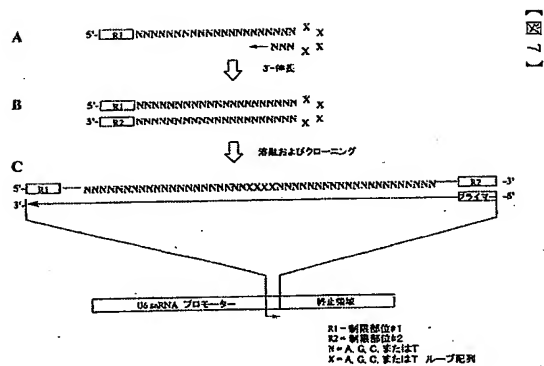


【図5】

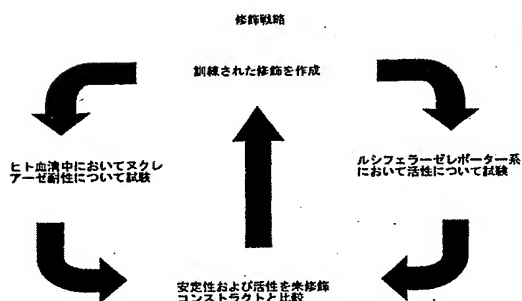


【図6】





R=O、S、N、アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカリール、またはアラルキル  
R'は独立して任意のRと同じオキシ塩基、天然に存在するものでも化学的に修飾されたものでもよい。またはH(置換基)



【手続補正書】

【提出日】平成16年10月19日(2004.10.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

### 【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【讀求項1】

RNA干渉(RNAi)によりHIV RNAの切断を指示する化学的に合成された二本

類短干涉核酸 (SINA) 分子であつて、

d) 副記S I N A分の各十の終は利19ニ利23ヌクノオサナトの致とあり、

b) 則記 \$S \sim V\$ の一方の類は、則記 \$H \sim V\$ の両方から成る。すなわち、 $S$  は  $V$  と同様に、 $H$  のような性質を持つ。

日副を令子：ちとびが  
N A + 夢により H I V  
K N A の 切腹を指小するの  
に「力な相補正を有する  
メソッド」

c) 前記の DNA 分子は RNA 王族を媒介するために、RNA 分子中に? - ヒートボックスを形成し、その DNA 列を形成する。

シ、其を有するマクトオホの存在を必要としない

NA分子、  
F、C、O、  
H、N、S、  
P、K、Ca、  
Mg、Fe、  
Zn、Cu、  
Mn、Co、  
Ni、Mo、  
V、Cr、  
B、Al、  
Si、  
Ge、  
As、  
Se、  
Te、  
I、  
Br、  
Cl、  
F、  
O、  
N、  
C、  
H、  
と

【請求項2】

前記 s i N A 分子がリボヌクレオチドを含まない。請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項3】

前記 s i N A 分子がリボヌクレオチドを含む，請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項4】

前記二本鎖 s i N A 分子の一方の鎖は H I V 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に

NAのヌクレオチド配列またはその一部に実質的に類似するヌクレオチド配列を含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項5】

s i n A分子の各鎖は約19一約23ヌクレオチドを含み、各鎖は他方の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19ヌクレオチドを含む、請求項4記載のs i n A分子。

【請求項6】

前記s i n A分子はH I V遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアプテセンス領域を含み、前記s i n Aはさらにセンス領域を含み、前記センス領域は前記H I V遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に実質的に類似するヌクレオチド配列を含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項7】

前記アプテセンス領域および前記センス領域は約19一約23ヌクレオチドを含み、前記アプテセンス領域はセンス領域のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19ヌクレオチドを含む、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項8】

前記s i n A分子はセンス領域およびアプテセンス領域を含み、前記アプテセンス領域はH I V遺伝子によりコードされるRNAのヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含み、および前記センス領域は前記アプテセンス領域に相補的なヌクレオチド配列を含む、請求項1記載のs i n A分子。

【請求項9】

前記s i n A分子は2つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられており、一方のフラグメントは前記s i n A分子のセンス領域を含み、第2のフラグメントは前記s i n A分子のアプテセンス領域を含む、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項10】

前記センス領域がリンカー分子を介してアプテセンス領域と連結されている、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項11】

前記リンカー分子がヌクレオチドリンカーである、請求項10記載のs i n A分子。

【請求項12】

前記リンカー分子が非ヌクレオチドリンカーである、請求項10記載のs i n A分子。

【請求項13】

センス領域中のペリミジンヌクレオチドが2'-O-メチルペリミジンヌクレオチドである、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項14】

センス領域中のプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドである、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項15】

センス領域中に存在するペリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロペリミジンヌクレオチドである、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項16】

前記センス領域を含むフラグメントは、前記センス領域を含むフラグメントの5'末端、3'末端、または5'末端および3'末端の両方に末端キヤップ成分を含む、請求項9記載のs i n A分子。

【請求項17】

前記末端キヤップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項16記載のs i n A分子。

【請求項18】

前記アプテセンス領域のペリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロペリミジンヌクレオチドである、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項19】

前記アプテセンス領域のプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドである、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項20】

前記アプテセンス領域中に存在するプリンヌクレオチドが2'-デオキシ-プリンヌクレオチドを含む、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項21】

前記アプテセンス領域が前記アプテセンス領域の3'末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項18記載のs i n A分子。

【請求項22】

前記アプテセンス領域が前記アプテセンス領域の3'末端にグリセリル修飾を含む、請求項6記載のs i n A分子。

【請求項23】

前記s i n A分子の2つのフラグメントのそれぞれが約21ヌクレオチドを含む、請求項9記載のs i n A分子。

【請求項24】

s i n A分子の各フラグメントの約19ヌクレオチドはs i n A分子の他方のフラグメントの相補的なヌクレオチドと塩基対形成しており、s i n A分子の各フラグメントの少なくとも2つの3'末端ヌクレオチドはs i n A分子の他方のフラグメントのヌクレオチドと塩基対形成していない、請求項23記載のs i n A分子。

【請求項25】

s i n A分子の各フラグメントの2つの3'末端ヌクレオチドのそれぞれが2'-デオキシ-ペリミジンである、請求項24記載のs i n A分子。

【請求項26】

前記2'-デオキシ-ペリミジンが2'-デオキシ-チミジンである、請求項25記載のs i n A分子。

【請求項27】

s i n A分子の各フラグメントの約21ヌクレオチドすべてがs i n A分子の他方のフラグメントの相補的なヌクレオチドと塩基対形成している、請求項23記載のs i n A分子。

【請求項28】

アプテセンス領域の約19ヌクレオチドがH I V遺伝子によりコードされるRNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している、請求項23記載のs i n A分子。

【請求項29】

アプテセンス領域の約21ヌクレオチドがH I V遺伝子によりコードされるRNAのヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している、請求項23記載のs i n A分子。

【請求項30】

前記アプテセンス領域を含むフラグメントの5'末端が任意にリン酸基を含む、請求項9記載のs i n A分子。

【請求項31】

薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に請求項1記載のs i n A分子を含む組成物。

【請求項32】

H I V RNAがH I V-1 RNAを含む、請求項1記載のs i n A。

【請求項33】

前記s i n Aが、配列番号1-1604のいずれかを含む、請求項1記載のs i n A。

【請求項34】

請求項32記載のs i n Aを薬学的に許容しうる担体または希釈剤とともに含む組成物。

【請求項35】

請求項33記載のs i n Aを薬学的に許容しうる担体または希釈剤とともに含む組成物。

フロントページの続き

- (31) 優先権主張番号 10/157,580  
(32) 優先日 平成14年5月29日(2002.5.29)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 60/386,782  
(32) 優先日 平成14年6月6日(2002.6.6)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 60/398,036  
(32) 優先日 平成14年7月23日(2002.7.23)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 10/225,023  
(32) 優先日 平成14年8月21日(2002.8.21)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 60/406,784  
(32) 優先日 平成14年8月29日(2002.8.29)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 60/408,378  
(32) 優先日 平成14年9月5日(2002.9.5)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 60/409,293  
(32) 優先日 平成14年9月9日(2002.9.9)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 60/440,129  
(32) 優先日 平成15年1月15日(2003.1.15)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

- (81) 指定国 AP(GU, GN, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AL, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TN), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GT, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MZ, NO, NZ, OM, PG, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (74) 代理人 100114465  
弁護士 北野 健  
(72) 発明者 マウスウイダン, シェームス  
アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールドー, フランクリン ドライヴ 4866  
(72) 発明者 ベーゼルマン, レオニド  
アメリカ合衆国 80503 コロラド州 ロングモント, コルト ドライヴ 5530  
(72) 発明者 メースジャク, デニス  
アメリカ合衆国 80004 コロラド州 アールバ, ユニオン ストリート 6595  
Fターム(参考) 4B024 MA01 MA20 CA11 CA20 HA17 HA20  
4C086 MA01 MA03 MA04 EA17 MA01 MA04 MA14 ZB33 ZC55



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成18年3月30日(2006.3.30)

【公表番号】特表2006-502694(P2006-502694A)

【公表日】平成18年1月26日(2006.1.26)

【年通号数】公開・登録公報2006-004

【出願番号】特願2003-569153(P2003-569153)

【国際特許分類】

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

(F1)

C12N 15/00 Z N A A

A61K 31/7105

A61P 31/18

【手続補正書】

【提出日】平成18年2月8日(2006.2.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

RNA干渉(RNAi)によりヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNAの切断を指示する化学的に合成された二本鎖短干渉核酸(sinA)分子であって、

a. 前記sinA分子の各鎖は18-27ヌクレオチドの長さであり、

b. 前記sinA分子のアンチセンス鎖は前記HIV RNAのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス鎖はアンチセンス鎖に相補的であり、および

c. 前記sinA分子は、センス鎖の5'末端および/または3'末端およびアンチセンス鎖の3'末端に少なくとも1つの化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む、

ことを特徴とするsinA分子。

【請求項2】

前記sinA分子がリボヌクレオチドを含まない、請求項1記載のsinA分子。

【請求項3】

前記sinA分子が1またはそれ以上のリボヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項4】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項5】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項6】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが2'-オームチルヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項7】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドがホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項8】

前記非ヌクレオチドが無塩基成分を含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項9】

前記無塩基成分が反転デオキシ無塩基成分を含む、請求項8記載のsinA分子。

【請求項10】

前記非ヌクレオチドがグリセリル成分を含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項11】

sinA分子の各鎖が19-23ヌクレオチドを含み、各鎖が他方の鎖のヌクレオチドと相補的な少なくとも19ヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項12】

前記sinA分子が2つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられており、一方のフラグメントは前記sinA分子のセンス領域を含み、第2のフラグメントは前記sinA分子のアンチセンス領域を含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項13】

前記センス領域がリンカー分子を介してアンチセンス領域に連結されている、請求項1記載のsinA分子。

【請求項14】

前記リンカー分子がポリヌクレオチドリンカーである、請求項13記載のsinA分子。

【請求項15】

前記リンカー分子が非ヌクレオチドリンカーである、請求項13記載のsinA分子。

【請求項16】

センス領域中のヒリミジンヌクレオチドが2'-オームチルヒリミジンヌクレオチドである、請求項1記載のsinA分子。

【請求項17】

センス領域中のプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドである、請求項1記載のsinA分子。

【請求項18】

センス領域中に存在するヒリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロヒリミジンヌクレオチドである、請求項1記載のsinA分子。

【請求項19】

前記センス領域を含むフラグメントが、前記センス領域を含むフラグメントの5'末端、3'末端、または5'末端および3'末端の両方に末端キャップ成分を含む、請求項12記載のsinA分子。

【請求項20】

前記末端キャップ成分が反転デオキシ無塩基成分である、請求項19記載のsinA分子。

【請求項21】

前記アンチセンス領域のヒリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロヒリミジンヌクレオチドである、請求項1記載のsinA分子。

【請求項22】

前記アンチセンス領域のプリンヌクレオチドが2'-オームチルプリンヌクレオチドである、請求項1記載のsinA分子。

【請求項23】

前記アンチセンス領域中に存在するプリンヌクレオチドが2'-デオキシ-プリンヌクレオチドを含む、請求項1記載のsinA分子。

【請求項24】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の3'末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項21記載のsinA分子。

【請求項25】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の3'末端にグリセリル修飾を含む、請求項1記載のs i n a分子。

【請求項26】

前記s i n a分子の2つのフラグメントのそれぞれが2 i s k l e o tを含む、請求項12記載のs i n a分子。

【請求項27】

s i n a分子の各フラグメントの約19ヌクレオチドはs i n a分子の他方のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成し、s i n a分子の各フラグメントの少なくとも2つの3'末端ヌクレオチドはs i n a分子の他方のフラグメントのヌクレオチドと塩基対形成しない、請求項26記載のs i n a分子。

【請求項28】

s i n a分子の各フラグメントの2つの3'末端ヌクレオチドのそれぞれが2'-デオキシ-2'-ヒミジンである、請求項27記載のs i n a分子。

【請求項29】

前記2'-デオキシ-2'-ヒミジンが2'-デオキシ-2'-ヒミジンである、請求項28記載のs i n a分子。

【請求項30】

s i n a分子の各フラグメントの2 i s k l e o tのすべてがs i n a分子の他方のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成する、請求項26記載のs i n a分子。

【請求項31】

アンチセンス領域の19ヌクレオチドがH I V遺伝子またはその一部によりコードされるRNAのヌクレオチド配列と塩基対形成する、請求項26記載のs i n a分子。

【請求項32】

アンチセンス領域の2 i s k l e o tがH I V遺伝子またはその一部によりコードされるRNAのヌクレオチド配列と塩基対形成する、請求項26記載のs i n a分子。

【請求項33】

前記アンチセンス領域を含むフラグメントの5'末端が任意にリン酸基を含む、請求項12記載のs i n a分子。

【請求項34】

H I V RNAがH I V-1 RNAを含む、請求項1記載のs i n a分子。

【請求項35】

許容可能な担体または希釈剤中に請求項1記載のs i n a分子を含む医薬組成物。